



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사 학위논문

즉석 식품에서 니트로사민이 검출되는 요인 분석

Factors Attributing to the Formation of
N-Nitrosamines in Instant Foods

2016년 8월

서울대학교 대학원

식품영양학과

서 보 경

즉석 식품에서 니트로사민이 검출되는 요인 분석

Factors Attributing to the Formation of
N-Nitrosamines in Instant Foods

지도교수 권 훈 정

이 논문을 생활과학석사 학위논문으로 제출함
2016년 4월

서울대학교 대학원
식품영양학과
서 보 경

서보경의 석사 학위논문을 인준함
2016년 6월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

즉석 식품에서 니트로사민이 검출되는 요인 분석

서보경

서울대학교 대학원 식품영양학과

니트로사민(N-nitrosamine)은 2차 아민과 아질산염이나 질산염으로부터 생성된 질소산화물과 반응하여 생성되는 발암물질로 식품의 제조·저장·조리과정에서도 생성될 수 있으며 물과 공기에서 오염원이 될 수도 있다. 국내에서 니트로사민의 기구 및 용기 포장 물질에 대한 규격은 고무제에 국한되어 있으며, 고무제 외의 용기 포장 물질에 대한 니트로사민 모니터링 연구가 부족하다. 가공식품의 소비가 늘어나면서 용기·포장물질의 사용도 증가하고 있다. 간편식으로 용기·포장물질 채로 조리하여 섭취하는 식품이 증가함에 따라 즉석식품 내 니트로사민 함량 증가의 원인을 규명하는 연구가 필요하다.

본 연구에서는 조리 시 함량 변화가 있는 3종의 니트로사민, 니트로소디메틸아민 (N-nitrosodimethylamine, NDMA), 니트로소디에틸아민 (N-nitrosodiethylamine, NDEA), 니트로소디부틸아민 (N-nitrosodibutylamine, NDBA)을 분석물질로 정하였다. 시료는 국내에 유통되는 식품 용기 포장물질 중 용기 채로 조리하는 물질 31종에 대하여 식품공전에서 규정하고 있는 식품유사용매를 이용하여 이행량을 평가하였다. 식품유사용매 중 물과 4% 초산용액은 Extrelut NT를 이용한 고체상지

지 액체추출법을 이용하였으며, n-헵탄은 Florisil 충진제를 이용한 고체상추출로 정제하였다. 정제액은 암모니아 기체를 통한 화학적 이온화법을 이용한 Gas Chromatography-Positive Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry (GC-PCI-MS/MS)로 분석하였다. 직선성 0.99이상, 방법검출한계 0.03~0.07 $\mu\text{g/kg}$, 방법정량한계 0.08~0.22 $\mu\text{g/kg}$ 으로 얻어졌다. 그 결과 NDMA는 ND~0.11 $\mu\text{g/kg}$, NDEA는 ND~0.09 $\mu\text{g/kg}$, NDBA는 ND~0.05 $\mu\text{g/kg}$ 의 범위로 검출되었으며 정량한계 미만의 값으로 얻어졌다. 용기포장 물질의 각 재질별로 내용물인 식품 13종을 선택하여 조리 전과 조리 후 시료의 분석이 이루어졌다. 지방함량 10%를 기준으로 하여 저지방 시료의 경우는 Extrelut NT 추출 후 Florisil 충진제를 이용한 고체상 추출을 통해 정제하였다. 고지방 시료의 경우는 아세톤과 아세토나이트릴을 사용한 액체 추출법을 사용하였으며, 이를 C-18 충진제에 알루미늄 가루를 혼합하여 고체상 추출을 진행하여 정제하였다. 정제액은 위와 같이 GC-PCI-MS/MS로 분석하였다. 분석 결과, 즉석밥 시료와 우동 시료에서는 조리 전과 조리 후 모두에서 검출이 되지 않거나 정량한계 미만으로 검출되었다. 레토르트 시료는 조리 전과 후 모두 정량한계 이상의 함량이 얻어졌으며 토마토소스 시료에서 포장을 제거하고 조리한 시료를 제외하고 조리과정에만 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 라면 시료에서는 조리 전 시료보다 조리 후 NDMA의 함량이 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 폴리스티렌(PS) 재질인 큰 컵라면에서 폴리에틸렌(PE) 재질인 작은 컵라면보다 NDMA가 유의적으로 높게 검출되었지만($p<0.05$), 용기를 이용한 조리과 용기를 이용하지 않은 조리과 유의미한 차이가 나타나지 않았기 때문에 용기 자체가 원인이라고 보기는 어렵다. 라면 시료의 조리 시 NDMA 증가의 원인을 분석하기 위해 조리수로 사용한 수돗물과 HPLC용 물을 조리 전후로 분석한 결과 모든 시료에서 NDMA가 불검출되었다. 컵라면 시료의 구성요소인 면, 분말스프, 건더기스프의 조합을 달리하여 HPLC용 물로 조리를 진행하여 분석한 결과, 면만 조리한 시료에서 NDMA가 정량한계 미만으로 검출되었으며, 분말스프만 조리한 시료,

면과 건더기스프를 조리한 시료에서는 검출되지 않았다. 하지만 면과 분말스프를 조리한 시료에서 trace~0.46 $\mu\text{g/kg}$ 으로 검출되었다. 따라서 컵라면 시료는 면과 분말스프를 함께 조리하였을 때 NDMA 함량이 증가하며 건더기스프도 NDMA 함량 증가에 기여하는 것으로 보아 식품구성요소 중 함유되어 있던 반응물이 조리 중 물에 용해되어 반응이 진행되었을 것으로 추정된다. 따라서 가열 조리 시 식품 내에서의 니트로사민 생성 원인물질을 파악하는 후속연구가 필요하다.

.....
주요어 : 니트로사민, 용기·포장물질, 가공식품, 조리

학 번 : 2014-22890

목차

국문초록	i
목차	iv
List of Tables	vi
List of Figures	vii
List of Abbreviations	viii
I. 서론	1
II. 용기 · 포장물질로부터 식품유사용매로 이행된 니트로사민 함량 ..	14
1. 서론	14
2. 재료 및 방법	19
2.1. 시료 및 기구 준비	19
2.2. 분석 대상	24
2.3. 시약 및 기기	24
3. 용출시험 및 니트로사민 분석	26
3.1. 식품유사용매를 이용한 용출시험	26
3.2. 용출시험액의 니트로사민 함량 분석	27
3.3. 분석법 검증	32
4. 결과 및 고찰	33
4.1. 분석법의 확인	33
4.2. 시료 용출시험액의 분석결과	36
III. 용기 · 포장물질을 이용한 식품 조리 시 니트로사민 함량 변화 ...	40
1. 서론	40
2. 재료 및 방법	42
2.1. 시료 준비	42
2.2. 분석대상	45
2.3. 시약 및 기기	45
2.4. 통계 분석	46
3. 니트로사민 함량 분석	47
3.1. 시료 전처리	47

3.2. 기기분석	49
3.3. 직선성 검증	49
4. 결과 및 고찰	52
4.1. 분석법의 직선성 확인	52
4.2. 식품 시료 내 니트로사민 함량 분석	55
4.3. 라면 시료의 구성요소 분석	66
IV. 요약 및 결론	70
V. Acknowledgement	72
VI. 참고문헌	73
Abstract	86

List of Tables

Table 1	Physical and chemical properties of some N-nitrosamines and carcinogen classification	7
Table 2	Regulations on N-nitrosamines contents	12
Table 3	Collected samples and food simulant for migration test ·	21
Table 4	GC-PCI-MS/MS condition for three N-nitrosamines analysis ·	30
Table 5	Multiple reaction monitoring conditions for N-nitrosamines and their internal standards	31
Table 6	Method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) of three N-nitrosamines in each food simulants (Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)	35
Table 7	Occurrences of three N-nitrosamines in food simulant water	37
Table 8	Occurrences of three N-nitrosamines in food simulant 4% acetic acid	38
Table 9	Occurrences of three N-nitrosamines in food simulant n-Heptane	39
Table 10	Food samples and their cooking method	44
Table 11	Method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) of three N-nitrosamines in three matrices(Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)	51
Table 12	Occurrences of three N-nitrosamines in foods which can be cooked with their packaging materials (Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)	59
Table 13	The weight (Unit: g) and proportion(%) of each constituent of instant noodles	65
Table 14	Contents of NDMA in various combinations of noodles, seasonings, dehydrated vegetable, water (Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)	69

List of Figures

Figure 1 N-nitrosation of secondary amines	3
Figure 2 Carcinogenesis mechanism of N-nitrosamine	8
Figure 3 Recommended units for migration test	22
Figure 4 Modified and detailed migration cell for migration test ..	23
Figure 5 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (water)	34
Figure 6 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (4% acetic acid)	34
Figure 7 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (n-heptane)	35
Figure 8 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (Fatless method)	53
Figure 9 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (Fatrich method)	54
Figure 10 Comparison of NDMA contents in instant noodles contained in PE and PS cups	63
Figure 11 Comparison of NDMA contents in sauces contained in retort pouch	64

List of Abbreviations

NDMA: N–nitrosodimethylamine

NMEA: N–nitrosomethylethylamine

NDEA: N–nitrosodiethylamine

NDBA: N–nitrosodibutylamine

NPYR: N–nitrosopyrrolidine

NPIP: N–nitrosopiperidine

NMOR: N–nitrosomorpholine

FCS: Food Contact Substances

PE: Polyethylene

PS: Polystyrene

PP: Polypropylene

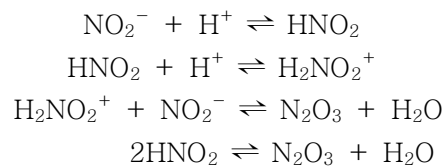
I. 서론

니트로사민(N-nitrosamine)은 ‘(R)₂N-N=O’의 N-니트로소화합물로 아민의 질소 원자에 결합한 알킬기의 종류에 따라 다른 성질을 보인다. 니트로사민과 이들의 전구체는 물, 토양, 공기 등의 환경, 식품, 화장품, 고무제, 담배연기 등에 존재한다(ASTDR, 1989; Kim, 2009). 니트로사민은 전구체와 아질산염에 의해 자연적으로 생성되기도 하고(Ender, 1964), 생체 내에서도 생성될 수 있다(Sen et al., 1969; Fine et al., 1977). 니트로사민은 휘발성과 비휘발성 니트로사민으로 구분되며, 비휘발성 니트로사민의 경우 휘발성인 것보다 발암성이 적지만 발암성을 지닌 다른 니트로사민의 전구체가 될 수 있다. 식품 내에서는 주로 휘발성인 N-nitrosodimethylamine(NDMA), N-nitrosomethylethylamine(NMEA), N-nitrosodiethylamine(NDEA), N-nitrosodibutylamine(NDBA), N-nitrosopyrrolidine(NPYR), N-nitrosopiperidine(NPIP), N-nitrosomorpholine(NMOR)과 비휘발성의 N-nitrosoproline(NPRO), N-nitrososarcosine(NSAR) 등이 있다(Herrmann, 2015; Table 1).

니트로사민은 2차 아민 또는 3차 아민이 아질산염, 질산염 등으로부터 생성된 질소산화물과 친전자성 반응을 하여 생성된다. 반응에 참여하는 아민 또는 아민 전구체는 단백질, 아미노산, 인지질 혹은 4차 암모늄염에서 생성이 된다(Gray and Dugan, 1975). 그리고 니트로소화 반응을 촉진시키는 질소산화물로는 무수아질산(N₂O₃), 니트로실 할로젠화물(NOX), nitrous acidium ion (H₂NO₂⁺)과 같은 화합물이 있다(Mirvish, 1975). 니트로사민의 생성은 pH와 아민의 염기성, 온도에 따라 좌우된다고 알려져 있다. 낮은 pH와 온도에서 1차 아민은 니트로사민을 생성하지 못하며 2차 아민의 염기성이 작을수록 니트로소화 반응이 쉽게 일어난다. 3차 아민으로부터는 니트로사민이 잘 생성되지 않는다(Mirvish, 1975; Rostkowska et al., 1998). 1차 아민의 경우 무수

아질산과 결합하여 니트로소 암모늄이온을 거쳐 diazohydroxide를 형성하고 물 분자가 떨어져 나가면서 diazonium ion이 생성되고 N_2 가 떨어져 나가면서 carbocation을 형성하게 된다. 이 양이온은 다른 아민과 결합하여 2차 아민을 형성할 수 있다. 그리고 2차 아민의 경우 마찬가지로 무수아질산과 결합하면서 암모늄이온을 형성하지만 이후 탈수가 아닌 탈수소화를 거치면서 니트로사민을 형성하게 된다(Rostkowska, 1998; Figure 1). 티오시안산염은 니트로사민 생성을 촉진할 수 있으며, 환원제 역할을 하는 물질인 아스코르브산, 토코페롤, 요소, 설파민산 암모늄, 탄닌산 등은 니트로사민의 생성을 억제할 수 있다(Mirvish et al., 1972; Fan and Tannenbaum, 1973a; Fan and Tannenbaum, 1973b; Gray and Dugan, 1975; Tricker, 1997). 아스코르브산은 아질산염과 산성 환경에서 빠르게 반응하여 산화질소(NO)와 산화형의 dehydroascorbic acid가 되고 이는 NDMA, NMOR의 생성을 90% 이상 억제한다고 한다(Gray and Dugan, 1975).

(a)



(b)

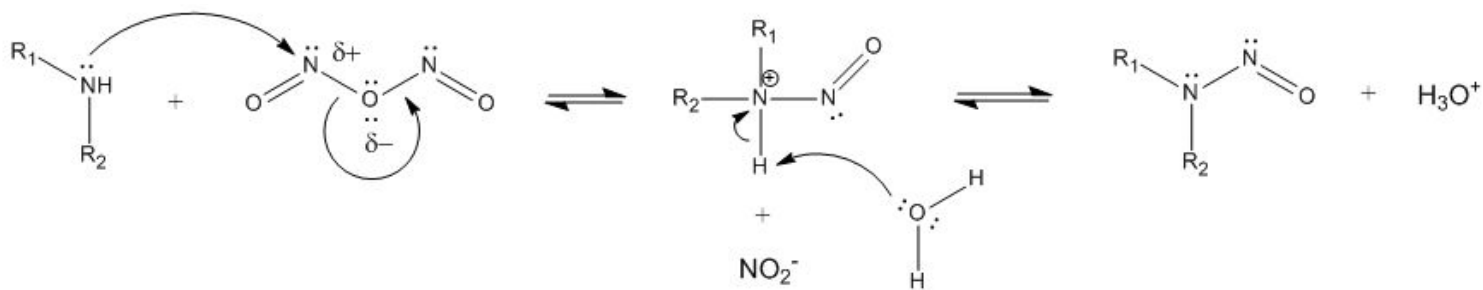
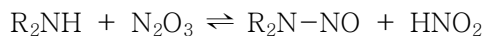


Figure 1 N-nitrosation of secondary amines

(a) Formation of a nitrous anhydride from nitrite

(b) Formation of a nitrosamine from a nitrous anhydride and a secondary amine

(Adapted from Mirvish, 1975; Rostkowska et al., 1998)

니트로사민은 간 독성을 계기로 독성에 대한 연구가 확대되었다. 간 경변증상이 니트로사민에 장기 노출된 3명의 작업자에게서 나타난 이후 NDMA의 발암성에 착안한 동물실험이 진행되었고 랫드, 토끼, 마우스, 기니피그, 개에서 급성독성과 간 손상을 확인하였다. 그리고 랫드의 경우 LD₅₀이 복강내 주사의 경우 26.5 mg/kg, 경구 투여의 경우 50 mg/kg이하로 얻어졌다(Barnes and Magee, 1954). 이어서 식이를 통해 NDMA를 50 mg/kg 섭취했을 경우 랫드 20마리 중 19마리가 26-40주 사이에 간 종양이 발견되었고 다른 장기에도 전이되는 현상을 확인하였다(Magee and Barnes, 1956). 이후에도 NDMA가 여러 동물에서 간세포 괴사, 간 종양을 보인 사례가 보고되었다(ATSDR, 1989; Maduagwu and Bassir, 1980; Sumi and Miyakawa, 1983; Lijinsky and Reuber, 1984). 간 외의 다른 장기에서도 발암성을 보이기도 한다. 마우스에 음용수를 통한 NDMA섭취와 피하주사를 실시하였을 때 간 종양과 더불어 폐와 신장에서도 종양이 발견되었고(Terracini et al., 1966), 랫드와 햄스터에 gavage를 진행하였을 때에도 NDMA에 의한 간, 폐, 신장 종양이 생긴 사례가 있다(Lijinsky et al., 1987). NDEA의 경우, 랫드에게 12.5 mg/ml의 용액을 0.2ml씩 주 2회로 20주 동안 gavage하였을 때 모든 랫드에 간 종양이 생겼으며 식도와 비강에도 종양이 발견되었다. 햄스터에게 10 mg/ml의 용액을 0.1ml씩 주 2회로 25주 동안 gavage하였을 때 간 종양이 확실하게 나타났으며 랫드보다는 적은 개체수이지만 비강에서도 종양이 생겼다(Lijinsky et al., 1987). 랫드와 햄스터에서 단회로 복강 내에 NDEA를 주사하였을 때 간세포 괴사가 발생하였으며, NDEA가 후각샘 세포의 당단백질 합성을 저해하여 세포의 괴사가 발생하였다(Jensen and Sleight, 1987). NDEA의 비강, 기관 및 기관지의 편평상피세포, 간, 식도, 신장에서 발암가능성은 다른 연구에서도 확인할 수 있다(Tanaka et al., 1988; Herrold and Dunham, 1963; Clapp and Craig, 1967; IARC, 1978). NDMA는 마우스에게 30 mg/kg/day와 7.6 mg/kg/day로 섭취시켰을 때

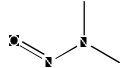
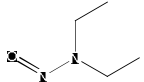
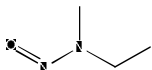
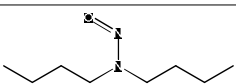
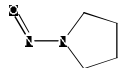
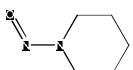

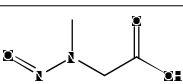
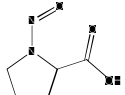
90마리 중 44마리, 89마리 중 19마리에게서 방광에서의 종양이 발견되었고 거의 모든 마우스에서 식도암이 발견되었다. 전위와 연구개 및 혀에서 종양이 발견되기도 하였다(Bertram and Craig, 1970). 랫드에게 gavage를 진행하였을 때 간, 비강, 식도암을 보였고 전위와 방광에서도 종양을 야기하였다(Lijinsky and Reuber, 1984). 이외에도 NDBA가 마우스, 랫드, 햄스터, 기니피그 등의 동물 중에 대해 간, 방광, 폐, 식도에 발암가능성이 있다고 알려져 있다(IARC, 1978).

니트로사민은 마이크로솜 효소인 cytochrome P-450에 의해 수산화반응과 탈탄산반응을 거쳐 알데히드를 생성하면서 모노알킬니트로사민 형태가 된다(Figure 2). 이 과정은 주로 cytochrome P-450 2E1과 2A6의 활성이 높았으며 NDMA는 2A1에 의해, NDEA는 2A6에 의해 활성화가 되었다(Yamazaki et al., 1992). 모노알킬니트로사민 중간체는 diazohydroxide형태와 diazoalkane형태를 거쳐 diazocation이 되며, 이는 carbonium ion과 N_2 로 분해된다. 이런 과정에서 생성된 diazoalkane과 carbocation은 DNA, RNA의 염기나 단백질과 같은 친핵체를 알킬화하여 돌연변이를 유발하여 암을 유발하게 된다(Rostkowska, 1998). 방사성 탄소를 표지한 NDMA를 랫드에 주입했을 때 DNA와 RNA에 알킬화된 7-methylguanine의 양이 간에서 높은 양으로 발견되었고 신장에서는 간의 1/10수준으로 발견되었다(Swann and Magee, 1968). 햄스터와 랫드에서 NDMA를 주입했을 때 7-methylguanidine과 O^6 -methylguanidine의 DNA adduct가 생성되며 DNA 수복능력을 벗어나면 종양이 발생하게 된다(Montesano, 1981; Bartsch and Montesano, 1984; Tricker and Preussmann, 1991).

이와 같이 독성과 발암성을 보이는 니트로사민에 대해 IARC (International Agency for Research on Cancer)는 발암등급을 구분하고 있으며, 그 중 분석대상인 NDMA와 NDEA는 인체발암성에 관한 근거자료가 불충분하

며 동물실험의 근거자료가 충분한 Group 2A로, NDBA는 인체발암성과 동물실험자료 모두 불충분한 Group 2B로 분류하고 있다(IARC, 2016; Table 1).

Table 1 Physical and chemical properties of some N-nitrosamines and carcinogen classification

N-nitrosamine	Chemical structure	Molecular weight	Phase transition temperature (°C) ^a	log K_{ow} ^{a,d}	IARC	US EPA
N-nitrosodimethylamine (NDMA)		74.08	154 ^b	-0.57	2A [*]	
N-nitrosodiethylamine (NDEA)		102.14	175–177 ^b	0.44		
N-nitrosomethylethylamine (NMEA)		88.11	161 ^b	-0.09	B2 [□]	
N-nitrosodibutylamine (NDBA)		158.24	235–237 ^b	2.57		
N-nitrosopyrrolidine (NPYR)		100.12	214–215 ^b	-0.10		
N-nitrosopiperidine (NPIP)		114.15	217–220 ^b	0.45	2B [†]	—
N-nitrosomorpholine (NMOR)		116.12	224 ^b	-0.44		—
N-nitrososarcosine (NSAR)		118.11	66–67 ^c	-0.78		—
N-nitrosoproline (NPRO)		144.13	106 ^c	—	3 [‡]	—

^a Data cited from articles in 'Reaxys database' and 'HSDB'

^b Boiling point at approx. 760Torr, ^c Melting point at approx. 760Torr., ^d Octanol/water partition coefficient

*2A: Probably carcinogenic to humans, [†]2B: Possibly carcinogenic to humans, [‡]3: Not classifiable as to its carcinogenicity to humans

[□]B2: Probably human carcinogen

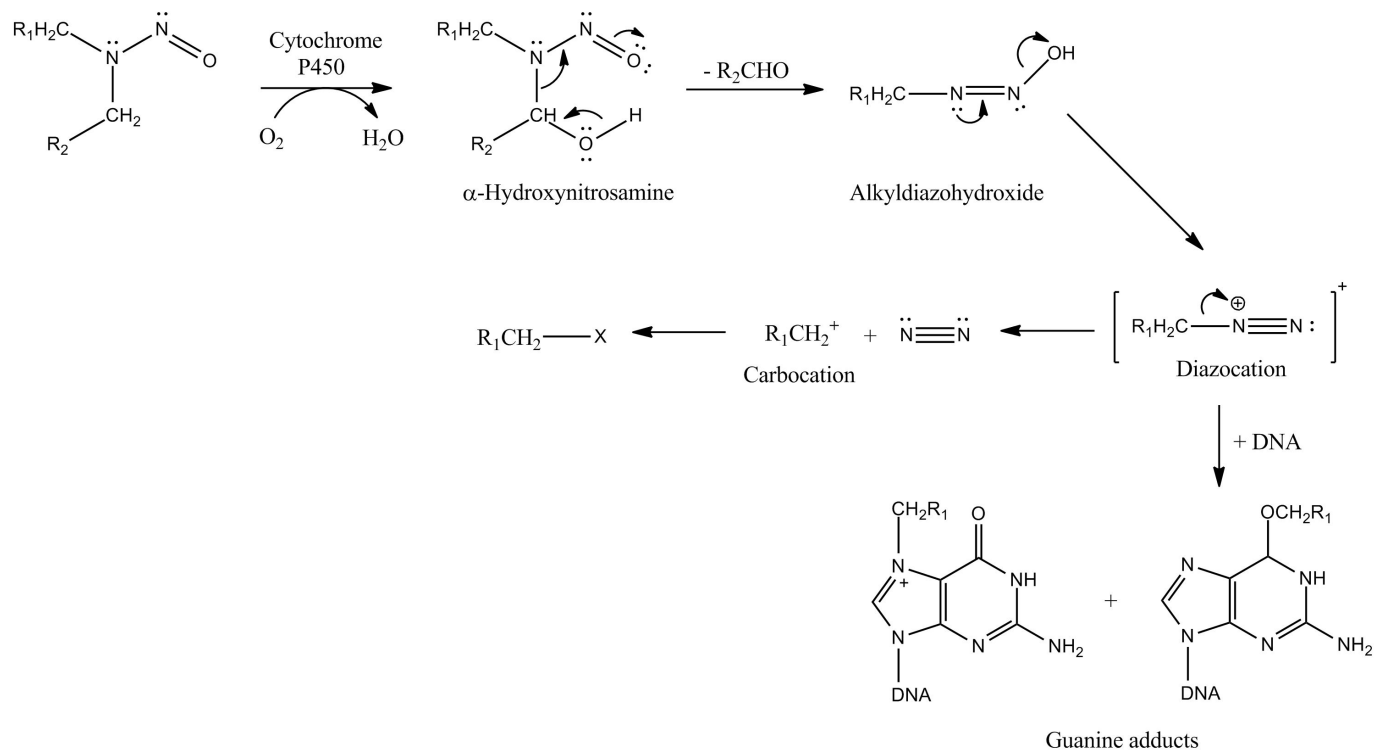


Figure 2 Carcinogenesis mechanism of N-nitrosamine

X: DNA, RNA, glutathione and other nucleophiles

(Adapted from Tricker and Preussmann, 1991; Rostkowska et al., 1998)

사람의 니트로사민에 대한 외인적 노출량은 $1.1 \mu\text{mol/day}$ 인데 식품섭취(72%), 작업환경에서의 노출(25%), 흡연(2%), 의약품, 화장품, 공기 등(1%)을 통해 노출된다고 한다(Tricker, 1997). 가장 높은 비율을 차지하는 식품에는 니트로사민 자체로 존재하였을 수도 있고, 식품 내에 존재하는 전구체 물질들에 의해 생성이 되었을 수도 있다. 이러한 식품 오염물질의 생성요인으로 환경에서의 오염, 식품이 운반되는 과정에서의 오염, 식품의 저장, 예열, 살균 등의 조건, 조리과정, 식품 포장, 포장된 식품의 저장과정 등을 들 수 있다(Nerin et al., 2016).

니트로사민은 토양과 물의 환경으로부터 오염이 될 수 있다. 수돗물의 정수 처리 과정 중 클로라민을 사용하는 경우 니트로사민이 생성된다. 모노클로라민(NH_2Cl)은 낮은 pH에서 디클로라민(NHCl_2)으로 전환된다(김평청, 1998). 전환된 디클로라민은 전하를 띄지 않는 아민과 반응하여 니트로사민을 형성한다. 염소 처리 시에도 클로라민 처리 시보다 훨씬 적지만 N_2O_4 의 중간체를 거쳐서 니트로사민을 형성하게 된다. 오존 처리 시에는 hydrazine, sulfamide와 같은 특정 전구체가 존재하면 2차 아민으로부터 NDMA가 생성된다고 한다. 또한 polyamine이나 polyDADMAC와 같이 아민기를 가지는 중합체를 응집제로 사용하거나 음이온교환수지를 사용할 경우 NDMA의 증가를 볼 수 있고 수돗물의 원수가 폐수로부터 2차 아민이나 니트로사민이 오염된 경우도 니트로사민 생성에 영향을 주었다(Krasner et al., 2013; Nawrocki and Andrzejewski, 2011). 니트로사민은 식품에 존재하며 식품을 저장, 조리하는 경우에도 생성되기도 한다. 질산염 비료의 사용, 토양의 물리브덴 부족, 물 부족 등의 영양 부족은 식물체 내의 질산염 축적을 가져온다(Lijinsky and Epstein, 1970; Wolff, 1972; Gangolli et al., 1994). 질산염은 세균과 포유류의 체내에서 쉽게 산화하여 아질산염을 생성할 수 있고 아질산염은 아민, 아미드, 아미노산과 결합하여 니트로

사민을 생성할 수 있다. 육색소 고정 및 *Clostridium botulinum*의 성장을 억제하는 목적으로 식품에 첨가하는 아질산염도 아민과 반응하여 니트로사민을 생성한다(Wolff, 1972; Gangolli et al., 1994). 아미노산의 탈탄산 반응이나 알데히드, 케톤의 아미노화 반응을 통해 생성되는 바이오제닉 아민은 농수축산물, 유가공품, 주류 등에서 발견이 되는데 이들은 2차 아민을 생성하고 식품 내의 아질산염과 반응하여 NDMA, NPIP, NPYR 등을 생성할 수 있다(Santos, 1996; Cappillas and Colmenero, 2004; Bulushi et al., 2009). 식품을 조리하는 과정에서 니트로사민의 함량이 변화한다. 식육가공품 중 베이컨, 햄, 페페로니, 초리조를 프라이팬과 오븐을 통해 열을 가한 결과 NPIP가 증가하고, NDMA, NDEA, NPYR, NPRO는 감소하는 경향을 보였다(Herrmann, 2015). 소세지를 굽거나 튀겼을 경우에 NDMA, NDEA, NPYR이 증가하고 끓이거나 전자레인지를 사용하여 조리하였을 경우에는 감소하는 경우도 있다(Li et al., 2012). 식품과 접촉하는 기구 및 용기 포장물질에서도 발견되는 사례가 있다. 종이제 포장물질 자체에서 NMOR이 최대 33ppb까지 생성되었고 식품과 접촉하는 면이 기여하는 바가 컸다. 최대치를 가지는 종이제에 담겨있던 밀가루는 NMOR이 1.1ppb로 얻어졌으며, 100도에서 3일간 식품에 용출되는 양을 확인한 결과, NMOR이 증가하는 경향을 보였다(Hotchkiss and Vecchio, 1983). 식육가공품을 포장하는 그물모양의 고무제에서 햄으로 NDBA가 이행되기도 하였으며(Pensabene et al., 1995), 유아용 젖병 젖꼭지에서 NDMA와 NDBA를 비롯한 총 니트로사민이 30ppb이상 검출된 연구도 있다(Sen et al., 1985). 고무제를 탄력있고 강도있게 만들 때 사용하는 가황 촉진제와 안정제의 dithiocarbamates, sulphenamides, thiuram sulphides 등은 니트로사민 생성의 전구체인 아민으로 분해될 수 있다. 또한 응고 지연제, 촉진제, 발포제 등도 분해되어 산화질소를 내놓아 니트로사민 생성에 기여할 수 있다(Spiegelhalder and Preussmann, 1983).

이렇게 다양한 경로로 노출이 가능한 니트로사민에 대해서 규제가 설

정되어 있다(Table 2). 식품 내 니트로사민 함량은 미국 FDA에서 barley malt에 대해 NDMA $5.0\mu\text{g/kg}$, 맥아음료에 대해 $10.0\mu\text{g/kg}$ 의 기준을 두었고, 중국에서 캔 형태의 제품을 제외한 식육, 어육가공품에서 NDMA가 각각 $3.0\mu\text{g/kg}$, $4.0\mu\text{g/kg}$ 이하로 설정하였다. 유럽연합과 한국에서는 고무젖꼭지에 대하여 총 니트로사민 함량 $10.0\mu\text{g/kg}$ 이하로 규제하고 있으며 니트로사민 생성 가능 물질에 대해서는 $100.0\mu\text{g/kg}$ 이하로 규제하고 있다. 유럽연합은 고무제 외에 36개월 미만의 아동이 사용하도록 하는 장난감이나 입으로 가져갈 만한 장난감에 대해 니트로사민 0.05 mg/kg 이하, 니트로사민 생성 가능 물질 1.0 mg/kg 이하가 되도록 규제하였다.

Table 2 Regulations on N–nitrosamines contents

Authority	Subject	N–nitrosamine	Maximum limit (μ g/kg)
KFDA	Baby nipples	NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR, NMOR	total 10.0
		N–nitrosatable substances	total 100.0
EU	Rubber teats and soothers	N–nitrosamines	total 10.0
		N–nitrosatable substances	total 100.0
	Toys*	N–nitrosamines	total 50.0
		N–nitrosatable substances	total 1000.0
US FDA	Barley malt	NDMA	10.0
	Malt beverage		5.0
	Baby nipples	Volatile N–nitrosamines	total 10.0
China	Meat products	NDMA	3.0
	Aquatic products	NDMA	4.0

* Toys intended for use by children under 36 months or intended to be placed in the mouth

국내 식품의약품안전처에서 니트로사민 노출량 평가를 진행하였고(김동술 외, 2009), ‘유해물질저감화 기반사업-25종’에서 니트로사민 7종(NDMA, NMEA, NDEA, NDBA, NPIP, NPYR, NMOR)에 대해 총식이조사를 3년간(2013년 9월~2016년 7월) 해오고 있다. 총식이조사의 내용으로 진행한 연구에서 용기·포장재에 담긴 식품 조리 시 니트로사민 함량이 증가되는 현상이 발견되었다(서정은, 2015; 박종은, 2016). ‘밥(즉석밥)-그대로’와 ‘밥(즉석밥)-데우기_끓는물’에서는 니트로사민 7종 모두 검출이 되지 않거나 정량한계 미만으로 검출되었지만 ‘밥(즉석밥)-데우기_전자레인지’에서는 NDMA, NDEA, NDBA의 함량이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한 용기 라면의 경우, ‘라면, 용기면, 스티로폼’, ‘라면, 용기면, 종이’와 ‘라면, 용기면, 플라스틱’에서 조리 전 시료보다 끓인 물을 추가하여 조리한 경우 NDEA가 2-3배 증가하였다. ‘자장, 레토르트’ 시료는 조리 전과 끓는 물로 데운 시료, 전자레인지로 데운 시료 모두 NDMA가 검출되었지만 조리 전과 조리 후에 따른 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 용기·포장물질에서 이행되는 니트로사민에 대한 연구는 고무제에만 한정되어 있어 니트로사민 함량 변화가 식품 자체의 변화 때문인지 용기사용에 따른 변화가 원인인지에 대한 규명이 필요한 실정이다. 따라서 국내 가열조리과정을 거치는 용기·포장물질에 대해 니트로사민 용출을 확인하고 용기·포장물질에 식품을 직접 조리하는 경우와 그렇지 않은 경우의 니트로사민의 함량 변화를 확인하였다.

II. 용기 · 포장물질로부터 식품유사용때로 이행된 니트로사민 함량

1. 서론

기구(器具)는 음식을 먹을 때 사용하거나 담는 용도나 식품 또는 식품첨가물을 채취·제조·가공·조리·저장·소분·운반·진열할 때 사용하는 것으로서 식품 또는 식품첨가물에 직접 닿는 기계·기구나 그 밖의 물건을 뜻한다. 용기·포장은 식품 또는 식품첨가물을 넣거나 싸는 것으로서 식품 또는 식품첨가물을 주고받을 때 함께 건네는 물품을 말한다(식품위생법 제2조 제4호 및 제5호).

식품의 종류가 다양해지고 섭취할 수 있는 형태도 다양해지고 있다. 식품 섭취의 간편성이 부각됨에 따라 가공식품이 점차 많아져 가공식품을 매일 구입하는 소비자의 비율이 2012년에 2.4%였던 것이 2014년에 8.9%가 되었고, 1주에 2번 이상 구입하는 소비자의 비율도 2012년 21.9%에 비해 2014년 41.1%로 크게 증가하였다. 또한 간편식을 구입한 소비자의 비율도 17.3% 증가하였다(한국농수산물유통공사, 2016). 국내 식품산업 생산실적을 살펴보면 기구 및 용기·포장과 관련한 업체수와 품목수는 2000년 이후로 꾸준히 증가하였고, 국내판매액도 꾸준히 증가하였다(통계청, 2016). 국내에서 식품용 기구 및 용기·포장의 재질은 합성수지제(38종), 셀로판제, 고무제, 종이제 또는 가공지제, 금속제, 목재류, 전분제, 유리제, 도자기제, 법랑 및 용기류의 8종으로 분류하여 관리하고 있다(식품의약품안전처, 2015). 국내 유통 중인 가공식품의 용기·포장에는 합성수지제(84.7%), 금속제(8.2%), 유리제(5.0%), 종이제(1.1%), 고무제(0.9%) 순으로 사용되며 합성수지제 중에서는 폴리에틸렌(PE, 46.3%), 폴리프로필렌(PP, 35.1%), 폴리에틸렌테레프탈

레이트(PET, 15.4%), 폴리스티렌(PS, 1.4%)순으로 사용되고 있다(김용석 외, 2012). 이 중에서도 식품을 포장되어 있는 상태로 조리할 수 있는 소재는 PE, PP, PS, 합성수지제로 코팅된 종이재, 금속재 등이 대부분이었다.

합성수지재 중 폴리에틸렌(Polyethylene, PE)은 에틸렌의 함유율이 50% 이상인 중합체로 에틸렌 중합 시에 1-propene, 1-butene, 1-hexene, 1-octene 모노머를 함께 첨가하여 중합하기도 한다. 결사슬의 정도 또는 밀도에 따라 저밀도 폴리에틸렌(Low-Density Polyethylene, LDPE)과 고밀도 폴리에틸렌(High-Density Polyethylene, HDPE), 선상 저밀도 폴리에틸렌(Linear LDPE)으로 분류한다. LDPE는 150-300도의 고온과 고압에서 소량의 산소나 유기 과산화물을 첨가하면서 합성할 수 있다. 투명성과 유연성이 좋으며 내한성이 좋아서 일회용 장갑이나 냉동식품 포장에 많이 사용된다. HDPE는 단일 모노머로 중합하고 그 과정에서 촉매(chromium oxide supported on silica or titanium halides and alkylaluminium compounds)를 사용하여 더 낮은 온도와 저압에서 형성이 된다. HDPE는 LDPE에 비해 불투명하며 유연성이 부족하지만 인장 강도가 강해 우유나 주스용기, 레토르트 포장재에 사용된다(Tice, 2003; 식품의약품안전처, 2014a). 식품에서 PE는 다른 플라스틱 소재와 라미네이트 된 형태로 사용한다. 주로 끓는 물에서 데우는 파우치 형태는 나일론(polyamide)과 겹쳐서 만들어지며, 산소를 막아 PE의 산화를 막는 알루미늄과 강도를 주는 종이재에 코팅하여 사용한다. 또한 수분차단성이 우수하고 용융점 이상으로 가열하였을 때 가지는 밀봉성의 장점 때문에 많이 사용된다(Tice, 2003).

폴리프로필렌(Polypropylene, PP)은 기본 중합체 중 프로필렌의 함유율이 50%이상인 합성수지를 말한다(식품의약품안전처, 2015). 폴리

프로필렌 단일중합체의 경우 메틸기가 한 방향으로만 배열되는 isotactic한 형태와 메틸기가 번갈아서 배열되는 syndiotactic형, 메틸기가 무작위로 배열되는 atactic형이 존재하며 주로 isotactic형이 사용된다. PP는 주로 ethylene이나 1-butene를 1-7%의 비율로 공중합체로 사용하기도 한다. 이러한 공중합체는 투명성이 좋고 녹는점이 낮아져서 낮은 온도에서 잘 부러지는 단점을 보완하였다(Tice, 2002). 폴리프로필렌은 강도와 인장강도가 좋고 내열온도가 121-165도로 높아 밀폐용기나 전자레인지 용기로 사용된다. 연신폴리프로필렌(Oriented polypropylene, OPP) 필름은 만들어진 필름을 기계적으로 늘려서 투명성, 강도, 수분과 가스차단성, 내저온성을 좋게 만든 것으로 가공식품의 날포장이나 빵포장 등에 사용된다. PE와 같이 종이제에 라미네이트하여 사용하기도 하며, 알루미늄이나 나일론, PET를 겹쳐서 레토르트 포장재로 사용하기도 한다(Tice, 2002; 식품의약품안전처, 2014a).

폴리스티렌(Polystyrene, PS)는 기본 중합체 중 스티렌 또는 α -메틸스티렌의 함유율이 50%이상인 합성수지제이며, 발포 폴리스티렌을 포함한다(식품의약품안전처, 2015). Styrene만을 단량체로 사용한 단일중합체는 일반 범용 PS(General Purpose PS, GPPS)라고 하며 투명하고 가벼우며 단단하여 일회용 컵이나 식품보관용기에 주로 사용한다. 충격에 약하고 유기용매나 기름에 취약해서 고지방이나 기름을 담는 데엔 사용하지 못한다. GPPS는 benzoyl peroxide와 같은 과산화물을 이용한 자유라디칼 공정으로 생산되며, 스티렌 희석액이나 스티렌을 물에 분산시킨 현탁액을 이용하여 중합하는 방법이 있다. 1,3-butadiene을 공단량체로 사용하면 내충격성 PS(High Impact PS, HIPS)가 되며 충격강도가 강해지는 대신 투명성을 잃으며 유기용매에 대한 저항성과 내유성이 강해진다. 냉동식품의 트레이, 요구르트나 아이스크림, 두부용기 등에 사용한다. HIPS는 polybutadiene 고무를 스티렌 단량체에 녹인 후 스티렌 라디칼에 의해 생성된다. 발포제를 이용한 발포 PS는 주로 완충재로 사용되며 충격에는 약하지만 단열성이 좋다. 일회용의 컵형 식품용

기나 즉석 식품의 용기에 주로 사용된다. 발포 PS는 PS 중합체에 휘발성 발포제를 첨가하는데 과거에는 chlorofluorohydrocarbons(CFCs)를 사용했지만 오존층 파괴물질이기 때문에 hydrocarbon pentane이나 butane으로 대체하였다(ILSI, 2002; 식품의약품안전처, 2014a).

종이제란 펄프를 주원료로 하여 제조한 것을 말하며, 가공지제란 종이제에 식품용 왁스, 합성수지제 또는 고무제 등으로 도장가공한 것을 말한다(식품의약품안전처, 2015). 주로 우유, 두유의 팩용기를 제조할 때 사용하며 내부코팅으로 PE를, 외부코팅으로 알루미늄과 PE를 주로 사용한다. 펄프는 물을 분사 시켜서 목재의 수용성 불순물을 제거하거나 수산화나트륨과 황산나트륨이나 아황산과 중아황산나트륨 등의 화학물질을 사용하는 방법으로 제조한다. 펄프 제조 후에는 고해과정을 거치는데 이 과정은 분리된 섬유질을 절단하고 수분을 흡수하여 팽창시키는 과정이다. 이 과정에서 종이의 물성을 조절하기 위해 전분, 백반, 산화 티타늄, 규조토, 카제인, 왁스 등의 첨가물들이 첨가되기도 한다(식품의약품안전처, 2013b).

알루미늄 금속제는 가열 후 급랭하는 고용체화 처리를 하여 과포화의 고용체를 형성한 후 다시 재가열하여 과포화 성분을 석출시키는 인공시효 처리를 한다. 고용체화 처리 온도와 인공시효 처리의 중간 온도까지 가열하여 석출된 미립자를 응집시키고 내부에 생긴 응력을 제거하여 재질을 연하게 하는 숙성과정을 거치면서 가공한다(식품의약품안전처, 2013b).

기구 및 용기·포장물질 제조 시 주원료 외에도 산화방지제, 정전기 방지제, 청징제, 소포제, 접착제 등 많은 첨가제들이 사용되며, 그 중에 아민 계열의 첨가제와 sodium nitrite와 같은 윤활제도 사용이 허가되어 있다(CFR 21 Part 174-178). 기구 및 용기·포장의 규제를 살펴보면

미국에서는 용기포장에서 식품으로 이행할 수 있는 물질들을 간접식품첨가물(Indirect Food Additives)로 분류하고 사전허가제로 관리하고 있다. 연방규정집(Code of Federal Regulations, CFR)에서 재질과 용도별로 사용가능한 물질, 사용량, 사용용도 등을 규정하고 있다. 유럽연합은 Regulation (EC) 1935/2004를 통해 식품접촉물질에 대한 기준을 설정하고 식품포장재 제조 시 사용가능한 물질 목록을 만들어 용도와 용출 규격을 설정하여 관리하고 있다. 국내에서는 다른 나라들과 다르게 원료물질이나 첨가제에 대한 허가가 아닌 최종제품에 대해 식품과 직접 접촉하여 식품으로 이행될 우려가 있는 유해물질을 각 재질별로 잔류규격과 용출 규격을 설정하여 관리한다. 니트로사민은 아민과 아질산염이 있는 환경에서 생성이 되며, 제조공정이나 식품 가공에서 쉽게 오염이 될 수 있다. 또한 열에 의한 포장물질과 식품 사이의 상호작용에 의한 생성가능성이 제기된다. 따라서 본 연구에서는 국내 유통 중인 재질에 대해 니트로사민의 이행량을 분석하여 용기에 담긴 식품의 조리 시 니트로사민 함량 변화가 나타난 원인을 파악하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 기구 준비

2.1.1. 용기 · 포장시료 수집

대형마트의 인터넷쇼핑몰에서 유통 중인 식품 중 용기 · 포장채로 조리하는 식품 31종류를 구매하였다. 내용물이 없는 상태의 용기 · 포장재를 직접 수집하는 데 어려움이 있어 구매한 형태에서 내용물을 최대한 제거하여 분석에 사용하였다. 수집한 시료는 폴리에틸렌 코팅 종이제 용기 6종류, 폴리에틸렌제 레토르트 포장재 1종류, 폴리스티렌제 용기 3종류, 폴리프로필렌 코팅 종이제 용기 3종류, 폴리프로필렌제 용기 9종류, 폴리프로필렌제 레토르트 포장재 8종류, 금속제 용기 1종류였다(Table 3). 시료는 반지름 약 4.4cm의 원형으로 잘라 시편으로 제조하였고 각 시료 당 3개의 시편을 용출시험에 사용하였다. 레토르트 포장재의 경우 두께가 얇기 때문에 3-4장을 덧대어서 용출시험을 진행하였다. 내용물이 포장재에서 완전히 제거되지 않은 경우 용출시험 전까지 식품보관 방법으로 보관하고 용출시험은 1-2일 안에 진행하였다.

2.1.2. 단면용출기구 제작

용출시험과 관련된 사항은 기구 및 용기포장의 기준 및 규격 고시전문(고시 제2014-27호)을 따랐다. 고시의 ‘2-6 재질별 용출시험용액의 조제’에 따르면 기구 및 용기 · 포장의 식품에 접촉하는 면은 물로 잘 씻은 후 용출시험을 진행하라고 명시되어 있지만 물에 의한 니트로사민 오염이 우려되므로 씻지 않고 최대한 이물질 제거하여 사용하였다. 또한 액체를 넣을 수 있는 용기 · 포장시료의 경우 용기 · 포장에 침출용액을 가득 채워 일정 온도 · 시간동안 방치한 것을 시험용액으로 사용하도록 명시하고 있다. 하지만 용기 · 포장의 모양이 다양하며 표면적을 계산

하기 어렵기 때문에 액체를 넣을 수 없는 시료의 표리가 동일치 않은 시료의 경우에 해당하는 용출시험법을 적용하였다(식품의약품안전처, 2014b). 이 용출시험법은 Figure 3과 같은 단면용출기구를 사용하도록 명시하고 있으며 용출기구(a)의 경우는 단힌 계로 유지하기 어려움이 있을 것으로 판단하여 용출기구(b)를 사용하기로 하였다. 용출표면적 1cm^2 당 식품유사용매 2mL의 비율로 침출을 진행하기 때문에, 고시 상에서 용출표면적을 100cm^2 으로 맞춰서 제시한 것 대신에 용출표면적을 50cm^2 으로 제작하여 용매사용량을 줄였다. Figure 3(b)의 용출기구 도면대로 용기를 제작하였을 때 용기·포장 시료 종류마다 시료의 두께가 달라 얇은 시료의 경우 용액이 새는 현상이 발생하였다. 또한 시편의 크기가 테플론 개스킷 외부까지 넘어갈 정도로 클 경우에도 침출용액이 샀다. 따라서 테플론 매트와 스테인리스 cell에 1mm 정도의 높이차를 두었고 시편의 직경을 cell의 직경보다 크게 테플론 개스킷보다는 작게 하여 클램프를 조였을 때 확실하게 새지 않도록 보완하여 제작하였다(Figure 4).

Table 3 Collected samples and food simulant for migration test

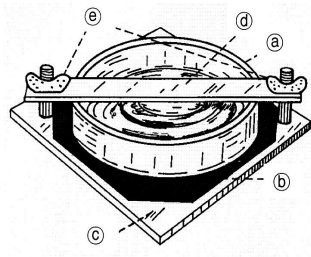
Material	Contained food	The number of samples	Simulant
PE ^a coated papers	Ramen	4	Water n-Heptane
	Beef soup	1	n-Heptane
	Lasagna	1	Water
PE packaging materials	Sauce	1	4% Acetic acid n-Heptane
PS ^b	Ramen	3	Water n-Heptane
	Noodles	1	Water
PP ^c coated papers	Stir-fried rice cake	1	4% Acetic acid
	Fried rice with sauce	1	Water n-Heptane
	Sauce/Stew	7	4% Acetic acid n-Heptane
PP packaging materials	Cooked rice	4	Water
	Fried rice	3	Water
	Chicken	1	n-Heptane
	Noodles	1	Water
	Bread	1	n-Heptane
Aluminium	Noodles	1	Water

^a PE: polyethylene

^b PS: polystyrene

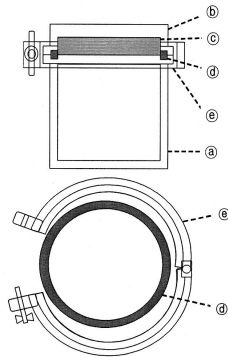
^c PP: polypropylene

Migration unit (a)



- ① : Stainless steel ring
(diameter: 11.28 ± 0.01 cm*)
- ② : Silicon mat
- ③ : Stainless steel plate
- ④ : Stainless steel bar
- ⑤ : Fixing nuts

Migration unit (b)

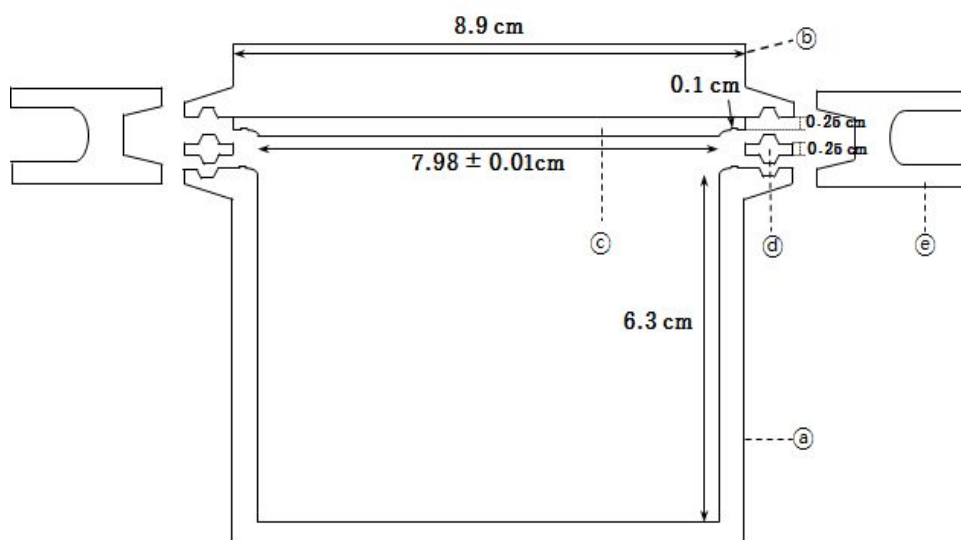


- ① : Stainless steel migration cell
(diameter: 11.28 ± 0.01 cm*)
- ② : Stainless steel lid
- ③ : PTFE^a mat
- ④ : PTFE ring
- ⑤ : Stainless steel clamp

Figure 3 Recommended migration units for single sided migration test (KFDA, 2014)

* : The actual area of the surface wetted by solution is 100cm².

^a PTFE: Polytetrafluoroethylene



Ⓐ : Stainless steel migration cell (diameter: 7.98 ± 0.01 cm*)

Ⓑ : Stainless steel lid

Ⓒ : PTFE^a mat

Ⓓ : PTFE ring

Ⓔ : Stainless steel clamp

Figure 4 Modified and detailed migration cell for migration test

* : The actual area of the surface wetted by solution is 50cm^2 .

^a PTFE: Polytetrafluoroethylene

2.2. 분석 대상

선행연구(서정은, 2015)의 식품 내 존재하는 니트로사민 7종의 분석 결과에서 조리를 했을 시 함량 변화가 가장 큰 NDMA, NDEA, NDBA 3종을 분석대상으로 선정하였다. 분석과정에서의 손실 등을 고려하여 정확한 정량을 하기 위해 각 3종 니트로사민에 대하여 내부표준물질을 사용하였다. 내부표준물질은 각 알킬기의 수소 원자를 중수소로 치환한 NDMA-d6, NDEA-d10, NDBA-d18을 사용하였다.

2.3. 시약 및 기기

분석대상인 니트로사민의 표준물질은 Supelco 사(USA)에서 EPA 8270 mix를 구입하여 사용하였고 내부표준물질은 Chiron 사(Norway)의 NDMA-d6, NDEA-d10, NDBA-d18을 각각 구입하여 혼합 후 사용하였다. 표준용액 및 내부표준물질용액의 제조와 전처리에 사용된 dichloromethane(DCM)은 Fisher 사(USA)의 pesticide grade용매를 사용하였다.

식품유사용매로 사용한 물과 4% 초산용액 제조 시 희석용으로 사용한 물, n-Heptane은 Fisher 사(USA)에서 HPLC 용 시약을 구입하여 사용하였고, acetic acid, glacial은 Samchun Chemical(Korea) 제품을 사용하였다. Extrelut NT는 Merck 사(Germany) 제품을 사용하였으며 Extrelut NT의 prewashing에 쓰인 n-hexane은 Samchun Chemical(Korea), DCM은 Fisher 사(USA)의 HPLC용 시약을 사용하였다. 전처리 과정에서 Extrelut 용출액으로 사용한 n-hexane은 Merck 사(Germany), DCM은 Fisher 사(USA)에서 모두 pesticide grade 시약을 사용하였다. 염기성 환경을 조성하는 데에는 0.1N과 1N sodium hydroxide solution은 Fluka 사(Switzerland)의 제품을 사용

하였다. SPE(Solid Phase Extraction)의 용출단계에서 쓰인 Methanol은 Acros 사(USA) pesticide grade 용매를 사용하였다. Sep-Pak Florisil Cartridge(1g, 6cc)는 Waters 사(USA) 제품을 사용하였다.

용출시험액 제조 시 이용한 항온수조는 Jeio Tech 사(USA)의 BS-21 Shaking & Heating bath를 사용하였다. 진탕기는 Scientific Industries 사(USA)의 Vortex-Genie 2를 사용하였고, 다량의 용매를 휘발시키는 데 사용된 회전감압농축기는 Jeio Tech 사(USA)의 aspirator, 냉각순환장치, Buchi 사(Switzerland)의 MultivaporTM P-12를 사용하였다. 마지막 단계의 농축에는 청민테크(Korea)의 질소 농축기 Hurricane-Lite를 사용하였다. GC-PCI-MS/MS는 Thermo Scientific 사(USA)의 Triplus RSH autosampler와 TSQ 8000 triple quadrupole mass spectrometer가 연결된 Trace 1310 Gas chromatography를 사용하였다. Agilent Technologies 사(USA)의 DB-5MS (5m × 0.53mm I.D., 0.25 μ m df)와 DB-WAX (60m × 0.25mm I.D., 0.50 μ m df)을 연결하여 분석하였다.

3. 용출시험 및 니트로사민 분석

3.1. 식품유사용매를 이용한 용출시험

선정된 시료 31종을 대상으로 식품유사용매로 용출하여 분석을 진행하였다. 식품유사용매 선택기준은 식품공전(식품의약품안전처, 2014)과 기구 및 용기포장 용출시험에 대한 식품유형별 침출용매 적용 가이드(식품의약품안전처, 2013a)를 참고하였다. 용기·포장물질이 접촉하는 식품이 지방함량이 20%이상인 식품인 경우 n-Heptane, 지방함량이 20%이하이면서 pH 5이하인 산성 식품은 4% 초산용액, pH 5이상이며 알코올성 식품이 아닌 식품은 물을 식품유사용매로 사용하였다. 라면은 식품의 지방함량이 20% 미만이지만 물과 n-Heptane 모두를 용출시험에 사용하였으며, 소스류와 찌개·국물류의 식품과 접촉하는 경우는 4% 초산과 n-Heptane 모두 침출용액으로 사용하였다.

용출시험은 단면용출기구에 표면적 1 cm^2 당 2 mL 비율로 침출용액을 넣어 진행하였다. 시료를 식품과 접촉하는 면을 용액과 맞닿도록 놓고 뚜껑을 닫은 후 용매가 새지 않도록 클램프를 조여 주었다. 용출기구를 거꾸로 하여 일정 온도로 맞춰둔 수조에 일정 시간동안 용출을 진행하였다. 온도와 시간 조건은 식품공전(식품의약품안전처, 2014b)의 내용을 따랐으며 그 내용은 다음과 같다.

3.1.1. 합성수지제와 금속제 용출시험 용액의 조제

용기·포장물질 시료 31종 중 합성수지제 및 금속제인 22종 모두 사용온도가 100°C 이상이므로 물과 4% 초산의 경우는 95°C 로 가온한 용액을 30분간 방치한 액을, n-Heptane의 경우 25°C 로 1시간동안 방치

한 액을 시험용액으로 사용하였다. 각각의 시료는 3회 반복실험을 실시하였다. 물과 4% 초산의 용출시험 용액은 50mL conical tube에 옮겨 담았고 n-Heptane의 용출시험 용액은 40mL 갈색 바이알에 옮겨 담아 -80℃에 보관하였다.

3.1.2. 종이제 용출시험 용액의 조제

용기·포장물질 시료 31종 중 종이제인 9종은 모든 침출용액에 대해 25℃로 10분 동안 방치한 액을 시험용액으로 사용하였고 각각의 시료는 3회 반복실험을 실시하여 분석에 사용하였다. 물과 4% 초산의 용출시험 용액은 50mL conical tube에 옮겨 담았고 n-Heptane의 용출시험 용액은 40mL 갈색 바이알에 옮겨 담아 -80℃에 보관하였다.

3.2. 용출시험액의 니트로사민 함량 분석

시료 전처리 방법은 선행연구(서정은, 2015)의 니트로사민 분석을 위한 전처리 방법의 일부를 적용하였다.

3.2.1. 시료전처리

(1) Extrelut NT Prewashing

Pyrex dish에 Extrelut NT 1200 mL를 세척용매(DCM: n-Hexane=7:3(v/v)) 1400 mL와 함께 넣고 rocking shaker에서 35rpm으로 15분간 진탕하였다. 1회 세척 후 세척용매를 최대한 따라버린 후 500ml의 새 세척용매를 추가로 넣어 다시 35rpm, 15분간 진탕하였다. 그리고 이 과정을 1회 더 반복하여 총 3회 세척하였다. 세척 후

진공필터를 이용하여 세척용매를 제거하고, Pyrex dish에 얇게 담은 후 35℃ 온풍으로 하룻밤 동안 건조시켜 분석에 사용하였다.

(2) 침출용매가 물인 용출시험액 전처리

내부표준물질 NDMA-d6, NDEA-d10, NDBA-d18를 DCM으로 희석하여 제조한 10ng/mL의 내부표준첨가용액을 전처리과정의 보정을 위해 사용하였다.

용출시험액 5g을 50mL polypropylene(PP) conical tube에 소분하였다. 이 tube에 0.1N NaOH 5mL를 넣어 염기성 환경을 조성한 후, 1mL의 내부표준첨가용액을 첨가하고 2분간 vortex로 진탕하였다. 고체상지지 액체추출을 위해 내경 2.0cm, 길이 25cm의 유리 컬럼을 사용하였고 glass wool로 컬럼의 바닥을 막은 후 약 6g의 Extrelut NT를 채워서 4분간 정치하였다. 시료를 컬럼에 넣어 Extrelut NT에 흡수시킨 후 용출액(DCM:Hexane=9:1 v/v) 5mL로 tube의 잔류물을 씻어 컬럼에 넣었고 이를 1회 더 반복하였다. 이후 용출액(DCM:Hexane=9:1 v/v) 40mL를 부어준 후 60mL 시험관에 1초에 한 방울의 속도로 받아 내었다. 컬럼 용출이 끝난 용액은 30℃이하의 온도에서 Multivapor를 이용하여 4mL까지 감압 농축하였다. 농축된 시료를 15mL 시험관에 옮겨 담고 25℃ 수욕 상에서 질소로 농축하여 1mL이하가 되도록 하였다. 이 농축액을 2mL 갈색 바이알에 옮긴 후 DCM을 채워 1mL로 맞춘 액을 GC로 분석하였다.

(3) 침출용매가 4% 초산인 용출시험액 전처리

용출시험액 5g을 50mL polypropylene(PP) conical tube에 소분하였다. 이 tube에 1N NaOH 5mL를 넣어 중화 및 염기성 환경을 조성한 후, 1mL의 내부표준첨가용액을 첨가하고 2분간 vortex로 진탕하였다.

이후의 실험과정은 ‘(2) 침출용매가 물인 용출시험액 전처리’와 동일하다.

(4) 침출용매가 n-Heptane인 용출시험액 전처리

용출시험액 5g을 60mL 유리 시험관에 소분하였다. 1mL의 내부표준 첨가용액을 첨가하고 뚜껑을 닫은 뒤 2분간 vortex로 진탕하였다. n-Hexane 6mL로 활성화시켜 준비한 Florisil 카트리지에 혼합액을 넣고 1초에 한 방울의 속도로 loading하였다. 60mL 시험관을 hexane 1mL로 3회 씻어 카트리지에 흘려준 후 3mL의 hexane을 추가로 더 흘려주어 washing하였다. DCM:Methanol 95:5 (v/v)혼합액 6mL로 용출한 후 받아낸 용출액을 25℃ 수욕 상에서 질소농축기를 이용하여 1mL 이하로 농축하였다. 이 농축액을 2mL 갈색 바이알에 옮긴 후 DCM을 채워 1mL로 맞춘 액을 GC로 분석하였다.

3.2.2. 기기분석

니트로사민 분석에 정립된 GC-PCI-MS/MS 분석조건을 적용하였다 (서정은, 2015; 박종은, 2016). Guard column으로는 DB-5MS(5m × 0.53mm I.D., 0.25 μm df)를 사용하였으며 main column으로 DB-WAX (60m × 0.25mm I.D., 0.50 μm df)을 사용하였다. 이동상 기체는 헬륨 가스를 유속 2mL/min으로 설정하였고 시료주입량은 2 μL로 하였다. 질량분석기의 이온화방식은 암모니아 기체를 reagent gas로 한 positive chemical ionization(PCI) 방식으로 하였다. 따라서 각 분석물질 및 내부표준물질의 precursor ion은 $[M+NH_4]^+$ 로 설정하였고 product ion 1은 $[M+H]^+$ 로 설정하였다. 세부 기기분석 조건과 SRM(Selected Reaction Monitoring)조건은 ‘Table 4’와 ‘Table 5’에 나타내었다.

Table 4 GC-PCI-MS/MS condition for three N-nitrosamines analysis

Column	Guard: DB-5ms (5m \times 0.53 mm I.D., 0.25 μ m df) Main: DB-wax (60m \times 0.25 mm I.D., 0.5 μ m df)
Flow rate	He, 2.0 mL/min
Inlet temp.	250°C
Inject volume	2 μ L
Oven	50°C (1 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 120°C (0 min) \rightarrow 5°C/min \rightarrow 170°C (10 min) \rightarrow 25°C/min \rightarrow 240°C (5 min)
Transfer line temperature	240°C
Source temperature	150°C
Reagent gas	Ammonia (NH ₃) gas (Flow: 2 mL/min)
Collision gas	Ar (cell pressure: 60Pa)

Table 5 Multiple reaction monitoring conditions for N-nitrosamines and their internal standards

Compounds	Retention time (min)	Precursor ion(m/z)	Product ion 1 (m/z)	Collision energy (eV)	Product ion 2 (m/z)	Collision energy (eV)
NDMA-d6	9.94	98	81	5	46	20
NDMA	9.94	92	75	5	43	20
NDEA-d10	11.30	130	113	5	81	15
NDEA	11.31	120	103	5	75	15
NDBA-d18	17.46	194	177	5	66	15
NDBA	17.75	176	159	5	57	15

3.3. 분석법 검증

3.3.1. 직선성 (Linearity)

각 표준물질의 농도 범위가 고르게 분포하도록 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g/kg}$ 의 8개 포인트에 대하여 검정곡선을 작성하였다. 각 농도에 해당하는 표준용액을 각 침출용매에 첨가하여 전처리를 거친 후, 3회 반복 측정하여 직선성을 확인하였다. 내부표준물질은 시료 내 농도 2 $\mu\text{g/kg}$ 가 되도록 첨가하였고, 각 축은 내부표준물질에 대한 비율로, y축은 area ratio, x축은 concentration ratio로 나타내었다.

3.3.2. 방법검출한계(Method Detection Limit, MDL) 및 방법정량한계(Method Quantitation Limit, MQL)

각 침출용매별로 5회 반복 측정한 공시험의 표준편차를 구한 후, 방법검출한계는 표준편차의 3.3배를 검정곡선의 기울기로 나눈 값, 방법정량한계는 표준편차의 10배를 검정곡선의 기울기로 나눈 값으로 결정하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1. 분석법의 확인

4.1.1. 분석법의 직선성 확인

표준물질과 내부표준물질의 concentration ratio를 x축으로, area ratio를 y축으로 하여 검정곡선을 그린 결과, 각 침출용매에 대해 Figure 5, 6, 7의 검정곡선을 얻었다. 선행연구에서와 마찬가지로(서정은, 2015; 박중은, 2016) 공시험을 실시한 결과에서도 니트로사민이 검출되기 때문에 y절편을 무시하지 않도록 추세식을 그렸다. 모든 침출용매에 대해 3종 니트로사민의 검정곡선 상관계수(R^2 , correlation coefficient)가 0.99 이상임을 확인하였다.

4.1.2. 분석법의 방법검출한계, 방법정량한계 확인

방법검출한계와 방법정량한계는 소수점 아래 셋째 자리에서 올림 하여 둘째 자리까지 나타내었으며 그 값은 Table 6에 나타내었다.

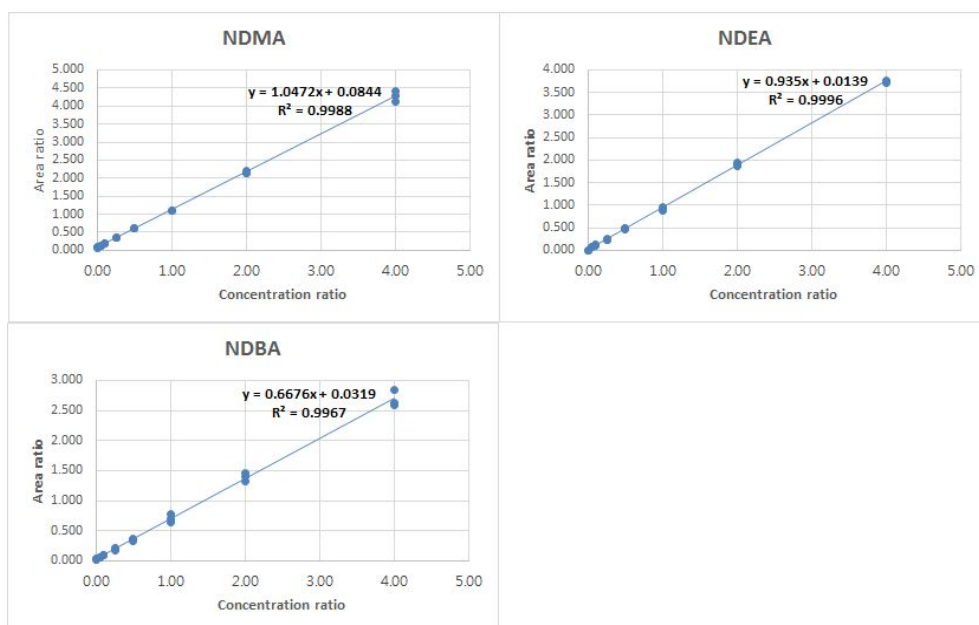


Figure 5 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (water)

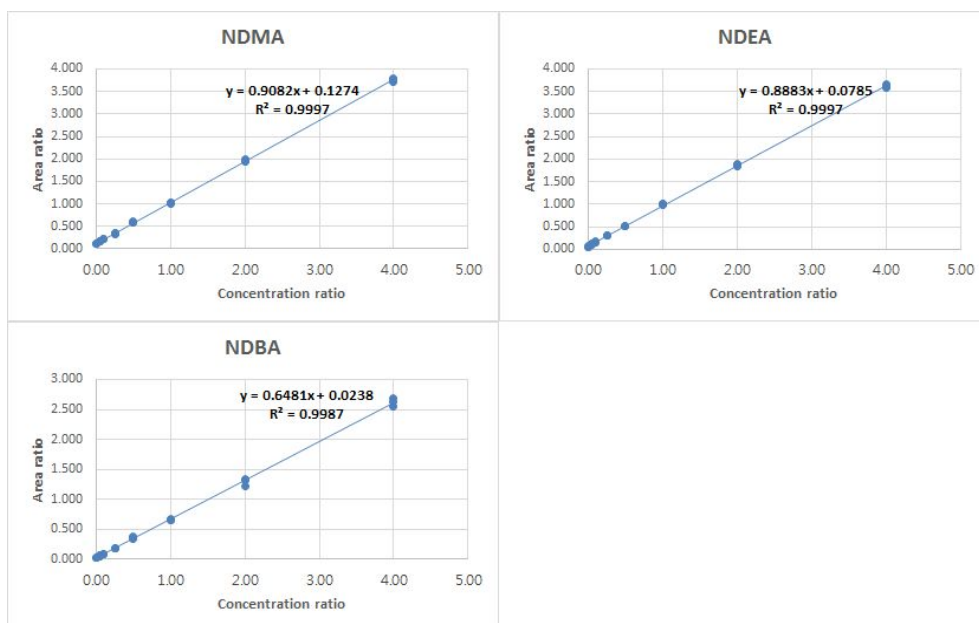


Figure 6 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (4% acetic acid)

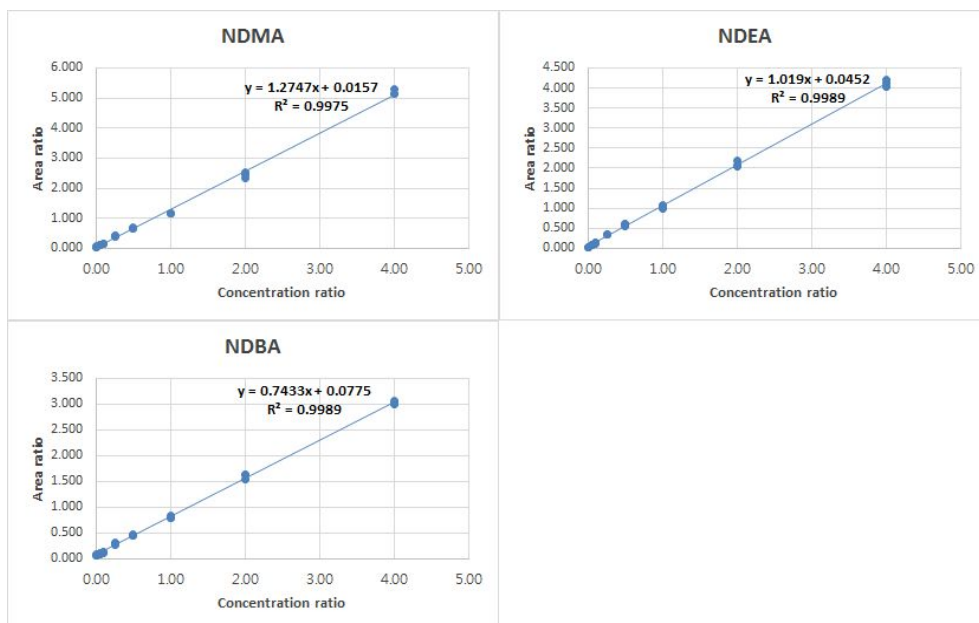


Figure 7 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (n-heptane)

Table 6 Method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) of three N-nitrosamines in each food simulants (Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)

Simulant		NDMA	NDEA	NDBA
Water	MDL	0.03	0.04	0.05
	MQL	0.11	0.14	0.17
4% acetic acid	MDL	0.05	0.03	0.03
	MQL	0.15	0.09	0.11
n-Heptane	MDL	0.06	0.02	0.07
	MQL	0.20	0.08	0.22

4.2. 시료 용출시험액의 분석결과

31종의 시료의 침출용매로의 니트로사민 이행량을 살펴본 결과, 침출용매가 물인 경우 NDMA는 $ND \sim 0.21 \text{ ng/cm}^2$, NDEA는 $ND \sim 0.17 \text{ ng/cm}^2$, NDBA는 검출되지 않았다. 4% 초산인 침출용매의 경우 NDMA는 $ND \sim 0.15 \text{ ng/cm}^2$, NDEA는 $ND \sim 0.11 \text{ ng/cm}^2$, NDBA는 검출되지 않았고, n-heptane의 경우는 NDMA가 검출되지 않았고 NDEA는 $ND \sim 0.09 \text{ ng/cm}^2$, NDBA는 $ND \sim 0.04 \text{ ng/cm}^2$ 로 검출되었다(Table 7, 8, 9). 하지만 모든 용출시험액에서 MQL미만의 함량으로 얻어졌다. 침출용매가 물인 경우, 다른 침출용매에 비해 NDMA 검출율이 63.1%로 검출되었다. 침출용매가 n-Heptane인 경우는 19건 중 NDMA가 검출된 시료가 없었으며, 다른 용매에서는 검출되지 않았던 NDBA가 2건의 시료에서 검출되었다. 이러한 차이는 분석물질의 수용성에 따른 차이와 용출 조건의 차이에서 기인하였을 것이라고 사료된다. 용출시험액의 니트로사민 함량 분석 결과, 정량한계 이상으로 검출된 시료가 없었기 때문에 용기·포장재에서의 용출이 조리 시 식품 내 니트로사민의 함량 증가를 초래한 것이라고 볼 수 없었다. 이에 용기와 식품 사이의 상호작용에 의해 차이가 발생했을 것이라 판단하여 후속 실험으로 식품시료 분석을 진행하였다.

Table 7 Occurrences of three N-nitrosamines in food simulant water

Material	Contained food	No. of sample	NDMA	NDEA	NDBA
PE coated papers	Ramen	1	— ^a	—	—
		2	—	—	—
		3	—	—	—
		4	trace ^b	—	—
	Lasagna	1	trace	—	—
PS	Ramen	1	—	—	—
		2	trace	—	—
		3	trace	trace	—
PP coated papers	Noodles	1	—	—	—
	Fried rice with sauce	1	trace	trace	—
PP packaging material	Cooked rice	1	trace	trace	—
		2	trace	—	—
		3	trace	—	—
		4	trace	—	—
	Fried rice	1	—	—	—
		2	—	—	—
		3	trace	—	—
	Noodles	1	trace	—	—
Aluminium	Noodles	1	trace	—	—

^a —: Not detected

^b trace: <MQL

Table 8 Occurrences of three N-nitrosamines in food simulant 4% acetic acid

Material	Contained food	The number of samples	NDMA	NDEA	NDBA
PE packaging material	Sauce	1	— ^a	—	—
PP coated papers	Stir-fried rice cake	1	trace ^b	trace	—
PP packaging material	Sauce/Stew	1	—	—	—
		2	—	—	—
		3	trace	—	—
		4	trace	trace	—
		5	trace	—	—
		6	trace	trace	—
		7	—	—	—

^a —: Not detected

^b trace: <MQL

Table 9 Occurrences of three N-nitrosamines in food simulant n-Heptane

Material	Contained food	The number of samples	NDMA	NDEA	NDBA
PE coated papers	Ramen	1	— ^a	—	—
		2	—	—	—
		3	—	—	—
		4	—	—	—
PE packaging material	Beef soup	1	—	—	—
	Sauce	1	—	—	—
PS	Ramen	1	—	—	—
		2	—	—	—
		3	—	—	—
PP coated papers	Fried rice with sauce	1	—	—	—
PP packaging material	Sauce/stew	1	—	—	—
		2	—	trace ^b	trace
		3	—	—	—
		4	—	—	—
		5	—	—	—
		6	—	—	—
		7	—	—	trace
	Chicken	1	—	—	—
	Bread	1	—	—	—

^a —: Not detected

^b trace: <MQL

III. 용기 · 포장물질을 이용한 식품 조리 시 니트로사민 함량 변화

1. 서론

니트로사민은 2차 아민 또는 3차 아민이 아질산염, 질산염 등에서 생성된 질소산화물로부터 생성된다. 식품 내 존재하는 아민 전구체는 단백질, 아미노산, 인지질 혹은 4차 암모늄염에서 생성된다(Gray and Dugan, 1975). 아미노산의 탈탄산 반응 또는 알데히드, 케톤의 아미노화 반응으로 생기는 바이오제닉 아민, 프롤린, 사르코신과 같은 아미노산, 콜린, 레시틴과 같은 인지질이 전구체로 작용할 수 있다(Wainright, 1986; Santos, 1996; Cappillas, 2004).

니트로사민은 식육가공품, 어육가공품, 유가공품, 구운 육류, 맥주, 절임식품 등에서 다른 식품에 비해 검출빈도가 높다(Tricker and Preussmann, 1991). 국내외의 니트로사민 실험을 살펴보면 구운 베이컨에서 NDMA는 최대 $5 \mu\text{g/kg}$ 까지 검출이 되었으며 NPYR $1\text{--}20 \mu\text{g/kg}$, NPIP는 $0.08\text{--}0.25 \mu\text{g/kg}$ 의 농도로 검출되었고 생선시료는 조리하지 않은 시료, 조리 및 가공한 시료 모두에서 NDMA가 검출되었다. 치즈에서도 NDMA가 검출되었지만 염지육에 비해서는 적게 검출되었다(Gough et al., 1978). 다른 연구에서는 조리 전의 육류에서는 NDMA, NDEA, NPYR, NPIP, NDBA 모두 검출되지 않았지만 육류를 훈제하거나 굽거나 튀겼을 때 5종의 니트로사민이 모두 증가하는 경향을 보였으며 통조림이나 절이기 등 가공과정을 거쳤을 때 NDEA를 제외한 4종의 니트로사민 함량이 증가하였다(Yurchenko and Molder, 2007). 이 밖의 연구에서도 식육가공품, 어육가공품 등에서 니트로사민이 검출되었다(Maki et al., 1980, Mitacek et al., 1998, Yamamoto et al., 1984).

식육가공품을 조리하였을 때 소시지와 살라미에서 NDMA 함량이 유의하게 증가하였으며, 구운 베이컨에서도 최대 NDMA $17.2 \mu\text{g/kg}$, NPYR $21.8 \mu\text{g/kg}$ 의 농도로 검출되었다(Sen et al., 1979). 국내 연구에서는 식육가공품 중 베이컨에서 NDMA가 검출율 100%로 $1.21\text{--}3.92 \mu\text{g/kg}$ 의 농도로 검출되었으며 소시지와 햄에서도 최대 $3.28, 3.45 \mu\text{g/kg}$ 의 농도로 검출되었다. 어육가공품과 젓갈류에서도 NDMA가 최대 $9.36 \mu\text{g/kg}$ 의 농도로 검출이 되었으며 맥주와 보리음료에서는 FDA 규제대상인 NDMA가 불검출이었고 NDEA와 NPIP가 검출되었다(김동술 외, 2009). 국내에서 이루어진 Total Diet Study연구에서도 축산물보다 축산가공품에서 니트로사민의 검출율과 함량이 더 높았다. 또한 식육가공품과 소고기, 돼지고기를 데치기, 굽기, 부치기의 조리를 하였을 때 NDMA 함량이 유의적으로 증가하였다(박종은, 2016). 이처럼 니트로사민은 식품을 가공하는 과정과 조리하는 과정에서 함량이 증가하는 경향을 보인다. 하지만 니트로사민 함량이 증가한 원인 분석에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 가공식품의 조리 시 니트로사민이 증가한 원인을 파악하기 위해 연구를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 준비

2.1.1. 식품시료 수집

수집한 시료의 각 재질별 식품을 용기채로 조리하였을 때의 니트로사민 함량 변화를 확인하고자 하였다. 폴리에틸렌 코팅 종이제와 폴리스티렌 용기는 라면 생산 상위 4사(농수산물유통공사, 2010)의 대표제품을 시료로 선정하였고, 레토르트 포장제품은 폴리에틸렌 재질의 자장 소스 1종류와 폴리프로필렌 재질의 자장과 카레 소스, 스파게티소스 각각 1종류씩을 시료로 선정하였다. 폴리프로필렌 용기는 즉석밥 시료 1종류, 폴리프로필렌 코팅 종이제는 우동 시료 1종류, 금속제 역시 우동 시료 1종류를 분석시료로 선정하였다. 각 시료는 대형마트의 인터넷쇼핑몰을 통해 구입하였다.

2.1.2. 식품시료의 조리

조리 전 식품 시료는 내용물 전체를 균질화하여 50mL conical tube 에 소분 및 밀봉한 후 -80℃에서 보관하였다가 분석하였다. 식품을 조리하는 방법은 각 제품에 명시된 조리법을 따랐다. 라면 시료는 끓는 물을 제품의 표시선까지 부은 후 명시된 시간동안 방치하였다. 레토르트 시료의 경우 다량의 물이 끓기 시작하면 레토르트 식품을 넣고 명시된 시간동안 방치한 후 꺼내었다. 즉석밥 시료는 끓는 물에서의 중탕과 전자레인지(700W) 조리 두 가지 방법을 사용하였고 폴리프로필렌 코팅 종이제 우동 시료의 경우 끓는 물을 표시선까지 붓고 전자레인지에서 조리를 진행하였다. 각 시료는 용기·포장채로 조리하는 것과 용기·포장을 이용하지 않고 조리하는 것으로 구분하여 시료를 제작하였다. 조리 시 필요한 조리수로는 Fisher 사의 HPLC용 물과 수돗물을 구분하여 조리하

였다. HPLC용 물 사용 시 포장물질을 이용하고 조리하는 것과 이용하지 않고 조리하는 것의 유의적인 차이가 없었기 때문에 실제로 섭취하는 형태로 수돗물을 이용한 조리는 용기 포장물질 채로 조리한 시료만 실험에 사용하였다. 시료 각각의 조리수 양과 조리시간은 Table 10에 나타내었다. 라면시료는 조리법에 쓰인 부피를 메스실린더로 잰 후 이의 질량을 기록한 뒤 물을 끓여 조리에 사용하였다. 용기·포장을 이용하지 않는 조리는 사기그릇에 시료를 담고 끓는 물을 부어 조리하였고 식히는 과정에서는 사기접시를 덮어서 외부환경과의 접촉을 막았다. 레토르트 시료의 포장을 이용하지 않고 조리하는 경우, 큰 냄비에 끓는 물을 준비하고 식품시료를 담은 14cm×8cm 크기의 스테인리스 냄비를 중탕하는 방식으로 조리하였다. 조리 후에는 시료를 사기그릇에 옮겨 식혔고 이를 균질화하여 tube에 소분 후 -80℃에서 보관하였다가 분석하였다.

Table 10 Food samples and their cooking method

Material	Contained food	Total sample weight (g)	The weight of added boiling water(g)	Cooking method
PE coated papers	Ramen A	65	248	stay 3 min.
	Ramen B	65	248	stay 3 min.
	Ramen C	65	257	stay 4 min.
PE packaging materials	Black soy bean sauce	120	–	put in boiling water 2 min.
PS	Ramen A	114	397	stay 4 min.
	Ramen B	115	397	stay 4 min.
	Ramen D	110	397	stay 3 min.
PP coated papers	Udon	222.5	297	microwave (700W) 4 min.
PP packaging materials	Curry	200	–	put in boiling water 3 min.
	Black soy bean sauce	200	–	put in boiling water 3 min.
	Tomato sauce	140	–	put in boiling water 3 min.
	Cooked rice	210	–	put in boiling water 10 min. or microwave(700W) 2 min.
Aluminium	Udon	524.6	–	boil on medium heat 2 min. and on high heat 10 min.

2.2. 분석대상

앞서 용출시험에서 분석한 대상과 마찬가지로 NDMA, NDEA, NDBA 3종을 분석대상으로 선정하였다. 각 3종 니트로사민에 대하여 내부표준 물질은 NDMA-d6, NDEA-d10, NDBA-d18을 사용하였다.

2.3. 시약 및 기기

분석대상인 니트로사민의 표준물질은 Supelco 사(USA)에서 EPA 8270 mix를 구입하여 사용하였고 내부표준물질은 Chiron 사(Norway)의 NDMA-d6, NDEA-d10, NDBA-d18을 각각 구입하여 혼합 후 사용하였다. 표준용액 및 내부표준물질용액의 제조와 전처리에 사용된 dichloromethane(DCM)은 Fisher 사(USA)의 pesticide grade용매를 사용하였다.

Extrelut NT는 Merck 사(Germany)제품을 사용하였으며 Extrelut NT의 prewashing에 쓰인 n-hexane은 Samchun Chemical(Korea), DCM은 Fisher 사(USA)의 HPLC용 시약을 사용하였다. Extrelut 용출액으로 사용한 n-hexane은 Merck 사(Germany), DCM은 Fisher 사(USA)에서 모두 pesticide grade 시약을 사용하였다. Acetone과 acetonitrile도 Fisher 사의 pesticide grade 시약을 사용하였다. 염기성 환경을 조성하는 데 쓰인 0.1N sodium hydroxide solution와 고지방 시료 전처리의 SPE단계에 쓰인 basic aluminium oxide는 Fluka 사(Switzerland)의 제품을 사용하였다. SPE(Solid Phase Extraction)의 용출 단계에서 쓰인 Methanol은 Acros 사(USA) pesticide grade 용매를 사용하였다. Sep-Pak Florisil cartridge(1g, 6cc)와 C-18 cartridge(500mg, 6cc)는 Waters 사(USA) 제품을 사용하였다.

식품시료 제조 시 시료 균질화에는 Braun 사(Germany)의 MQ725을 사용하였고 저울은 Dretec 사(Japan)의 KS-208CR을 사용하여 계량하였다. 진탕기는 Scientific Industries 사(USA)의 Vortex-Genie 2를 사용하였고, 고지방 시료의 추출에는 LaboGene 사(Denmark)의 1580R 냉장고속원심분리기를 사용하였다. 다량의 용매를 휘발시키는 데 사용된 회전감압농축기는 Jeio Tech 사(USA)의 aspirator, 냉각순환장치, Buchi 사(Switzerland)의 MultivaporTM P-12를 사용하였다. 질소농축기는 청민테크(Korea)의 Hurricane-Lite를 사용하였다.

2.4. 통계 분석

각 식품 시료마다 조리 전후와 포장 재질에 따른 유의적인 차이를 검증하기 위해 SAS(9.4)를 사용하였으며, 이원배치 분산분석을 실시하고, 사후검증을 위해 Tukey's HSD test를 실시하였다($p < 0.05$).

3. 니트로사민 함량 분석

3.1. 시료 전처리

우동과 즉석밥 시료는 지방함량이 10%미만으로 저지방 시료의 전처리 방법(서정은, 2015)을 적용하였다. 라면과 소스류의 지방함량은 모두 20%미만이지만 저지방 시료의 전처리 방법으로는 시료의 지방이 완벽하게 제거되지 않아 선행연구(박종은, 2016)의 니트로사민 분석을 위한 고지방 시료의 전처리 방법을 적용하였다.

식품시료의 전처리에는 내부표준물질 NDMA-d6, NDEA-d10, NDBA-d18를 DCM으로 희석하여 제조한 25ng/mL의 내부표준첨가용액을 전처리과정의 보정을 위해 사용하였다.

(1) Extrelut NT Prewashing

Pyrex dish에 Extrelut NT 1200 mL를 세척용매(DCM:n-Hexane=7:3(v/v)) 1400 mL와 함께 넣고 rocking shaker에서 35rpm으로 15분간 진탕하였다. 1회 세척 후 세척용매를 최대한 따라버린 후 500ml의 새 세척용매를 추가로 넣어 다시 35rpm, 15분간 진탕하였다. 그리고 이 과정을 1회 더 반복하여 총 3회 세척하였다. 세척 후 진공필터를 이용하여 세척용매를 제거하고, Pyrex dish에 얇게 담은 후 25℃ 온풍으로 하룻밤 동안 건조시켜 분석에 사용하였다.

(2) 저지방 시료 전처리

균질화된 검체 5g을 50mL polypropylene(PP) conical tube에 소분하였다. 이 tube에 0.1N NaOH 5mL를 넣어 염기성 환경을 조성한 후,

1mL의 내부표준첨가용액을 첨가하고 2분간 vortex로 진탕하였다. Extrelut NT 약 6g을 tube에 넣고 시료와 골고루 섞이게 한 후 glass wool로 컬럼의 바닥을 막은 내경 3.7cm, 길이 15cm의 유리 컬럼에 넣었다. 용출액(DCM:Hexane=9:1 v/v) 5mL로 tube의 잔류물을 씻어 컬럼에 넣었고 이를 1회 더 반복하였다. 이후 용출액(DCM:Hexane=9:1 v/v) 40mL를 부어준 후 60mL 유리 시험관에 1초에 한 방울의 속도로 받아내었다. 컬럼 용출이 끝난 용액은 30℃이하의 온도에서 Multivapor를 이용하여 4mL까지 감압 농축하였다. 농축된 시료는 n-hexane 6mL로 활성화를 시켜둔 Florisil cartridge에 넣고 1초에 한방울의 속도로 흘려주었다. n-hexane 1mL씩 3번 시험관의 잔류물을 씻어 cartridge에 넣고 3mL의 n-hexane을 추가로 넣어 washing하였다. Cartridge에 용액이 다 내려가면 DCM:MeOH=95:5(v/v)용액 6mL로 용출하여 15mL 시험관에 받았다. 이를 25℃ 수욕 상에서 질소로 농축하여 1mL이하가 되도록 하였다. 이 농축액을 2mL 갈색 바이알에 옮긴 후 DCM을 채워 1mL로 맞춘 액을 GC로 분석하였다.

(3) 고지방 시료 전처리

균질화된 검체 약 5g을 소분해둔 50mL polypropylene(PP) conical tube에 1mL의 내부표준첨가용액을 첨가하고 2분간 vortex로 진탕하였다. Acetone:Acetonitrile=1:1(v/v)용매 20mL를 tube에 넣고 2분간 vortex로 진탕하고 다시 20mL를 첨가하여 2분간 vortex하여 액체 추출을 진행하였다. 3000 rpm, 4℃조건에서 4분 동안 원심분리를 진행한 후, -80℃에서 20분간 방치하였다. 하층에 지방층이 언 것을 확인한 후 3000 rpm, -4℃에서 4분간 원심분리를 진행하였다. 상층액을 지방이 딸려오지 않도록 조심스럽게 60mL 유리 바이알에 옮겨 담고 25℃ 수욕 상에서 질소로 농축하여 15mL 이하가 되도록 하였다. 박종은(2016)의 선행연구에서는 Multivapor를 사용하였지만 농축과정의 오염이 의심되어 질소 농축으로 농축을 진행하였다. SPE는 C-18 cartridge에 약 2g의 basic aluminium oxide를 채워 사용하였다. 이 cartridge를

acetonitrile 20mL로 씻어내고 새 60mL 유리 바이알로 교체한 뒤 질소로 농축한 용액을 1초에 한 방울의 속도로 받아내었다. 농축액을 다 받은 후에는 acetonitrile 25mL를 추가로 흘려주었다. 이 용출액을 30℃ 수욕 상에서 질소로 농축하여 1mL 이하가 되도록 하였다. 농축액을 2mL 갈색 바이알에 옮긴 후 acetonitrile로 채워 1mL로 맞춘 액을 GC로 분석하였다.

3.2. 기기분석

니트로사민 분석에 정립된 GC-PCI-MS/MS 분석조건을 적용하였다(서정은, 2015; 박중은, 2016). Guard column으로는 DB-5MS(5m × 0.53mm I.D., 0.25 μm df)를 사용하였으며 main column으로 DB-WAX (60m × 0.25mm I.D., 0.50 μm df)을 사용하였다. 이동상 기체는 헬륨 가스를 유속 2mL/min으로 설정하였고 시료주입량은 2 μL로 하였다. 서정은(2015), 박중은(2016)의 선행연구에서는 고지방 시료의 경우 주입량을 4 μL로 하였지만 실험에 의한 손실량이 많지 않고 기름에 의한 오염이 우려되어 2 μL로 줄였다. 질량분석기의 이온화방식은 암모니아 기체를 reagent gas로 한 positive chemical ionization(PCI) 방식으로 하였다. 따라서 각 분석물질 및 내부표준물질의 precursor ion은 $[M+NH_4]^+$ 로 설정하였고 product ion 1은 $[M+H]^+$ 로 설정하였다. 방법검출한계(MDL)와 방법정량한계(MQL)은 서정은(2015)의 저지방 액체와 고체시료, 박중은(2016)의 고지방 고체시료의 MDL, MQL을 기준으로 진행하였다(Table 11).

Table 11 Method detection limit(MDL) and method quantitation limit(MQL) of three N-nitrosamines in three matrices (Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)(Adapted from Park et al., 2015; Seo et al., 2016)

Matrix		NDMA	NDEA	NDBA
Fatless liquid (Apple juice)	MDL	0.10	0.10	0.10
	MQL	0.30	0.30	0.30
Fatless solid (Rice soup)	MDL	0.12	0.10	0.15
	MQL	0.35	0.30	0.46
Fatrich solid (Beef)	MDL	0.12	0.10	0.19
	MQL	0.38	0.30	0.60

3.3. 직선성 검증

각 표준물질의 농도 범위가 고르게 분포하도록 0, 0.1, 0.2, 1, 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ 의 8개 포인트에 대하여 검정곡선을 작성하였다. 각 농도에 해당하는 표준용액을 각 침출용매에 첨가하여 전처리를 거친 후, 3회 반복 측정하여 직선성을 확인하였다. 내부표준물질은 시료 내 농도 5 $\mu\text{g/kg}$ 가 되도록 첨가하였고, 각 축은 내부표준물질에 대한 비율로, y축은 area ratio, x축은 concentration ratio로 나타내었다.

4. 결과 및 고찰

4.1. 분석법의 직선성 확인

표준물질과 내부표준물질의 concentration ratio를 x축으로, area ratio를 y축으로 하여 검정곡선을 그린 결과, Figure 8, 9의 검정곡선을 얻었다. 선행연구에서와 마찬가지로(서정은, 2015; 박종은, 2016) 공시험을 실시한 결과에서도 니트로사민이 검출되기 때문에 y절편을 무시하지 않도록 추세식을 그렸다. 모든 침출용매에 대해 3종 니트로사민의 검정곡선 상관계수(R^2 , correlation coefficient)가 0.99 이상임을 확인하였다(Figure 8, 9).

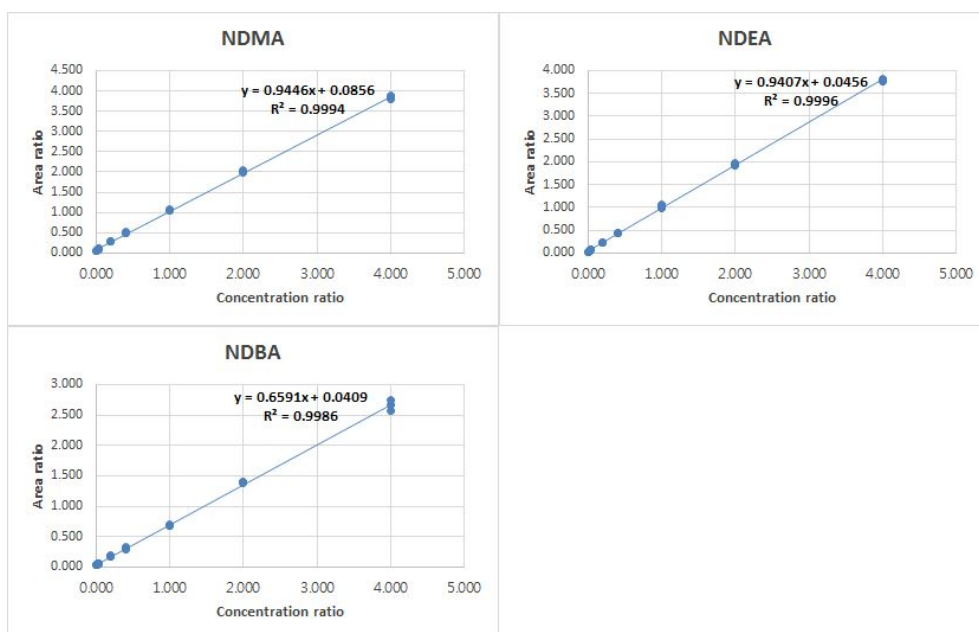


Figure 8 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (Fatless method)

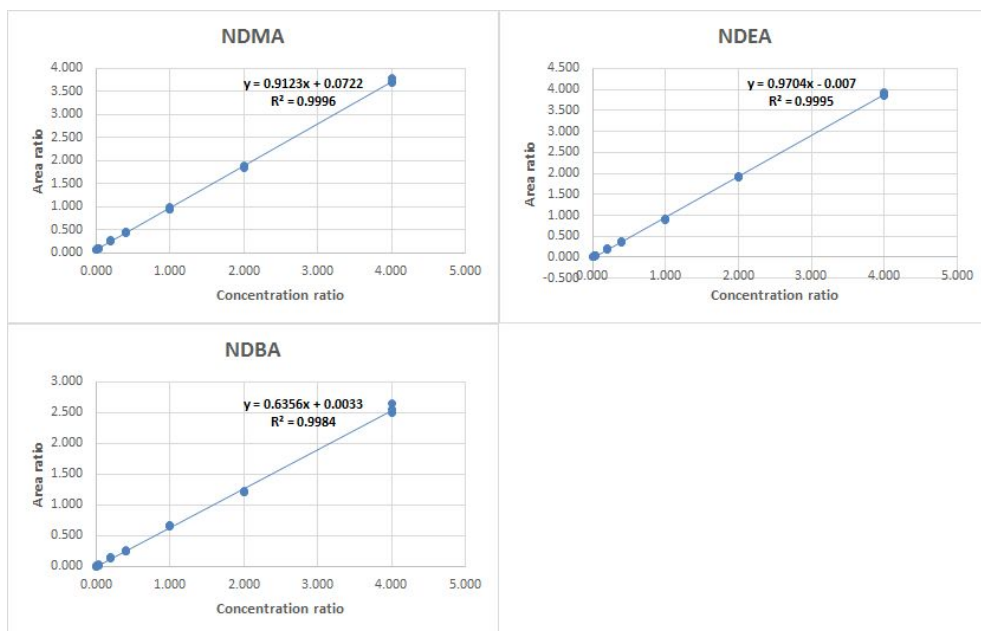


Figure 9 Calibration curves of three N-nitrosamines with internal standards (Fatrich method)

4.2. 식품 시료 내 니트로사민 함량 분석

기구 및 용기포장물질 채로 조리하는 식품의 조리 전과 조리 후의 니트로사민 함량 변화를 조사한 결과를 Table 12에 나타내었고 시료간의 유의성을 Figure 10와 11에 도식하였다. PP 토마토소스 레토르트에서 NDBA가 미량으로 검출된 것을 제외하고 모든 시료에서 NDEA, NDBA는 검출되지 않았다.

(1) 우동 시료

PP 코팅 종이제의 우동 시료에서는 조리, 용기의 유무와 관계없이 모두 니트로사민이 검출되지 않았다. 금속제인 알루미늄 용기의 우동 시료는 조리 전, 후 모두에서 NDMA가 미량 검출되었다. 우동 시료의 경우 서정은(2015)의 연구에서도 ‘우동국수라면_그대로’에서 NDBA가 미량, ‘끓이기’ 시료에서 NDEA가 미량으로 검출된 것 외에 니트로사민이 불검출되었다.

(2) 즉석밥 시료

PP 용기를 사용한 즉석밥 시료에서도 조리, 용기의 유무와 관계없이 모두 니트로사민이 검출되지 않았다. 서정은(2015)의 연구에서는 ‘밥(즉석밥)-그대로’에서 NDEA가 미량으로 검출되었고 끓여서 데운 시료에서는 니트로사민이 불검출되었으며 전자레인지로 데운 시료에서는 NDMA, NDEA, NDBA, NMOR가 검출되었다. 본 연구와는 전자레인지로 데운 시료끼리 차이가 있지만 이는 Total Diet Study의 시료는 pooling한 시료이기 때문에 개별 시료와 차이를 보인 것으로 사료된다.

(3) 레토르트 시료

PE 레토르트 시료에서 조리 전 NDMA는 $0.54 \pm 0.33 \mu\text{g/kg}$, 포장된 채로 끓인 시료는 $0.84 \pm 0.20 \mu\text{g/kg}$, 냄비에 중탕하여 끓인 시료는 $1.27 \pm 0.45 \mu\text{g/kg}$ 로 검출되었으며 조리 전, 후의 유의적인 차이는 보이지 않았지만 조리 후 함량이 증가하는 경향을 보였다. PP레토르트 시료에서 토마토 미트소스에서도 모든 형태에서 NDMA가 검출되었으며, 조리 전 시료와 포장 채로 조리한 시료 간에는 유의미한 차이가 없었지만 포장을 제거하고 조리한 시료 간에는 유의한 차이가 있었다. 카레와 짜장은 조리 전 시료에서도 각각 $3.81 \pm 0.97 \mu\text{g/kg}$, $1.65 \pm 0.13 \mu\text{g/kg}$ 의 함량을 보였으며 조리 전과 후에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 박종은(2016)의 연구에서도 NDMA의 함량이 ‘카레-조리 전’에서 $4.65 \pm 0.28 \mu\text{g/kg}$ 과 ‘자장, 레토르트-조리 전’에서 $4.79 \pm 0.41 \mu\text{g/kg}$ 로 검출되었다. ‘카레, 분말-조리 전’에서 불검출되었고 ‘카레, 분말-끓이기’에서 미량으로 검출되었다는 선행연구의 결과와 비교하면 레토르트 제품에서 NDMA의 함량이 증가함을 볼 수 있다. 분말 외에도 물, 양파, 당근, 감자, 고기 등의 재료를 넣고 끓인 제품이기 때문에 증가하였을 것이라 추정된다. 춘장과 자장의 바이오제닉 아민을 살펴본 연구에서 자장소스를 만드는 과정에서 바이오제닉 아민이 열분해됨을 확인하였다. 춘장은 히스타민($\sim 273\text{mg/kg}$)과 티라민($\sim 131\text{mg/kg}$)이 많은 양 존재하며, 니트로사민 생성과 관련이 깊은 푸트레신($\sim 28.59\text{mg/kg}$), 카다베린($\sim 2.04\text{mg/kg}$), 스퍼미딘($\sim 11.63\text{mg/kg}$), 스퍼민($\sim 1.49\text{mg/kg}$)이 존재하였다. 자장에서는 히스타민과 푸트레신이 춘장에 비해 유의적으로 감소하였고 스퍼미딘과 스퍼민이 유의적으로 증가하였다. 또한 총 바이오제닉 아민이 춘장에서 자장으로 200도에서 조리하는 과정에서 70%이상 감소하는 것을 확인하였다(Bai et al., 2013). 따라서 바이오제닉 아민이 분해되면서 NDMA, NPIP, NPYR의 함량이 증가된다는 연구와 같이(Bulushi et al., 2009; Drabik-Markiewicz et al., 2011) 자장으로의 조리과정에서 바이오제닉 아민이 분해되면서 니트로사민이

생성되었을 것이다. 레토르트 시료에서 포장 채로 조리한 것과 포장을 제거하고 조리한 것의 유의한 차이가 없었으므로 용기·포장에 의한 영향은 미미한 것으로 보인다.

(4) 컵라면 시료

컵라면 모든 조리 전 시료에서 NDMA가 검출되지 않았지만 모든 조리 후 시료에서는 $\text{trace} \sim 0.93 \mu\text{g/kg}$ 로 검출됨을 확인할 수 있었다. 그러나 모든 컵라면 그룹에서 용기 채로 조리한 시료와 용기를 제외하고 조리한 시료, 용기 채로 수돗물로 조리한 시료 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. ‘Noodle soup’에서 질산염이 조리 전, 후 모두 $40 \sim 260\text{mg/kg dry}$, ‘Vegetable-noodle soup’에서 조리 전 $150 \sim 680\text{mg/kg dry}$, 조리 후 $160 \sim 610\text{mg/kg dry}$ 만큼의 질산염이 검출된 보고가 있다(Garcia-mata et al., 1995). 질산염이 환원된 아질산염은 니트로사민 생성의 전구체로서 이 같은 연구는 라면에서의 니트로사민 생성을 설명할 수 있다. 라면 스프의 성분에는 여러 가지 맛 분말과 후추가루, 고춧가루, 추출물분말 등이 함유되어있다. 건고추와 고춧가루에서 NDMA가 각각 $1.37 \mu\text{g/kg}$, $2.74 \mu\text{g/kg}$ 이 검출되었고 NPYR이 각각 $1.53 \mu\text{g/kg}$, $3.12 \mu\text{g/kg}$ 이 검출되었다는 보고가 있다(Tricker et al. 1988). 조미료에서의 니트로사민 함량을 확인한 연구에서는 19개 시료 중 3개의 시료에서 5, 5, $20 \mu\text{g/kg}$ 의 NDMA가 검출되었으며, NPYR은 1개의 시료, NPIP는 16개의 시료에서 검출되었다(Gough T.A. and Goodhead K., 1975). 이러한 연구를 바탕으로 라면에서의 니트로사민 생성요인을 스프라고 추정하였다. 또한 분석결과, 같은 제조사의 PE 라면그룹과 PS 라면그룹 간에는 NDMA가 유의적인 차이를 보였다. PE와 PS 그룹 각각 용기 채로 조리한 것과 그렇지 않은 시료 간의 유의적인 차이는 없었으므로 용기에서 이행된 니트로사민 차이라고 보기 어렵다. 이들 PE 작은 용량과 PS 큰 용량과의 라면 구성요소의 비율을 살펴보면(Table 13) 물의 비율은 PE 그룹이 더 크고 면, 분말스프, 건더기스프의 비율이 PS 그룹에서 더 큰 것을 확인할 수 있다. 또한

식품성분표에 따르면 PE 그룹과 PS 그룹의 분말스프에 들어가는 성분이 차이가 있었음을 알 수 있었다. 따라서 PE와 PS 그룹 간 차이는 각 라면별 제조과정의 차이에서 기인하였다고 추정된다.

Table 12 Occurrences of three N-nitrosamines in foods which can be cooked with their packaging materials
(Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)

Material of FCS ^a	Contained food	Company	Cooking water	Sample type	NDMA	NDEA	NDBA
PE coated papers	Ramen	A	Non	Uncooked	— ^b	—	—
			HPLC grade water	Cooked with FCS	trace ^c	—	—
			HPLC grade water	Cooked without FCS	trace	—	—
			Tap water	Cooked with FCS	trace	—	—
			Non	Uncooked	—	—	—
		B	HPLC grade water	Cooked with FCS	trace	—	—
			HPLC grade water	Cooked without FCS	trace	—	—
			Tap water	Cooked with FCS	trace	—	—
			Non	Uncooked	—	—	—
		C	HPLC grade water	Cooked with FCS	0.39 ± 0.17	—	—
			HPLC grade water	Cooked without FCS	0.39 ± 0.19	—	—
			Tap water	Cooked with FCS	0.55 ± 0.09	—	—

Table 12 (Continued)

PS	Ramen	A	Non	Uncooked	—	—	—
			HPLC grade water	Cooked with FCS	0.62 ± 0.16	—	—
			HPLC grade water	Cooked without FCS	0.78 ± 0.14	—	—
			Tap water	Cooked with FCS	trace	—	—
		B	Non	Uncooked	—	—	—
			HPLC grade water	Cooked with FCS	0.85 ± 0.18	—	—
			HPLC grade water	Cooked without FCS	0.93 ± 0.04	—	—
			Tap water	Cooked with FCS	0.68 ± 0.14	—	—
		D	Non	Uncooked	—	—	—
			HPLC grade water	Cooked with FCS	0.87 ± 0.22	—	—
			HPLC grade water	Cooked without FCS	0.82 ± 0.26	—	—
			Tap water	Cooked with FCS	0.57 ± 0.21	—	—

Table 12 (Continued)

PP packaging material	Curry	C	Non	Uncooked	3.81 ± 0.97	—	—
			Non	Cooked with FCS	2.98 ± 0.19	—	—
			Non	Cooked without FCS	2.92 ± 0.17	—	—
	Black soy bean sauce	C	Non	Uncooked	1.65 ± 0.13	—	—
			Non	Cooked with FCS	1.46 ± 0.02	—	—
			Non	Cooked without FCS	1.41 ± 0.13	—	—
	Tomato sauce	E	Non	Uncooked	0.71 ± 0.16	—	trace
			Non	Cooked with FCS	0.84 ± 0.11	—	trace
			Non	Cooked without FCS	1.31 ± 0.11	—	trace
	Cooked rice	F	Non	Uncooked	—	—	—
			Non	Cooked with FCS—boil	—	—	—
			Non	Cooked without FCS—boil	—	—	—
			Non	Cooked with FCS—microwave	—	—	—
			Non	Cooked without FCS—microwave	—	—	—

Table 12 (Continued)

PE packaging material	Black soy bean sauce	A	Non	Uncooked	0.54 ± 0.33	—	—
			Non	Cooked with FCS	0.84 ± 0.20	—	—
			Non	Cooked without FCS	1.27 ± 0.45	—	—
PP coated papers	Udon	G	Non	Uncooked	—	—	—
			HPLC grade water	Cooked with FCS	—	—	—
			HPLC grade water	Cooked without FCS	—	—	—
			Tap water	Cooked with FCS	—	—	—
Aluminium	Udon	G	Non	Uncooked	trace	—	—
			Non	Cooked with FCS	trace	—	—
			Non	Cooked without FCS	trace	—	—

^a FCS: Food contact substance

^b —: Not detected

^c trace: <MQL

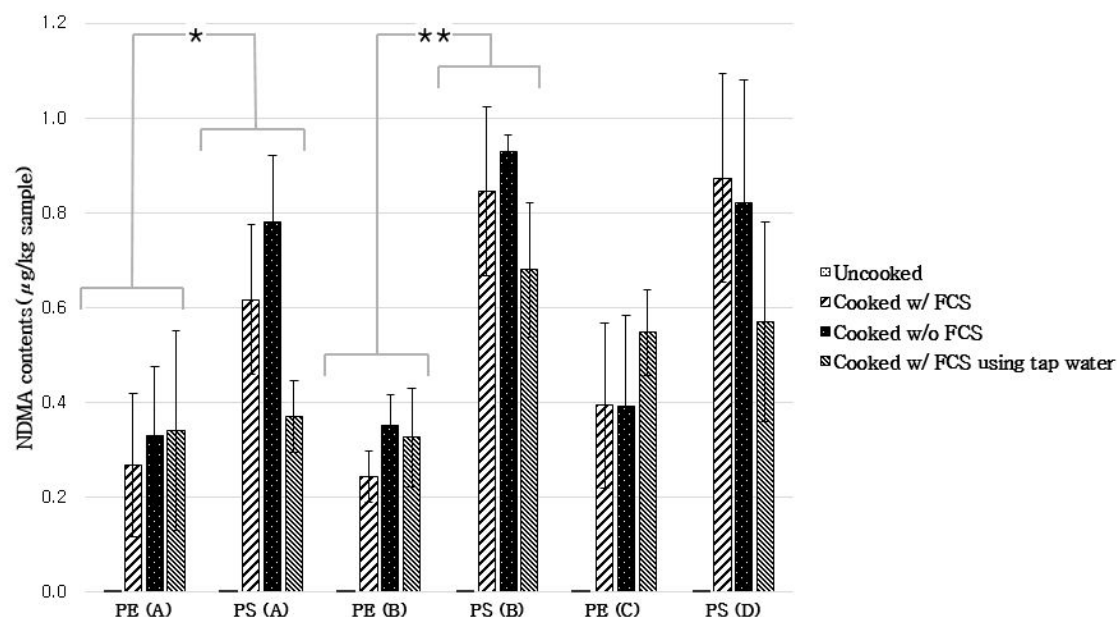


Figure 10 Comparison of NDMA contents in instant noodles contained in PE and PS cups

In all groups, contents of NDMA in the cooked samples were significantly increased compared to that of the uncooked samples. There were no significant differences between cooked samples in all groups. Error bars indicate standard deviations calculated from triplicates. 'Cooked w/FCS, Cooked w/o FCS' are cooked using HPLC grade water.

* Significant differences between the instant noodles in PE cup and in PS cup ($p < 0.05$) which were manufactured by company A.

** Significant differences between the instant noodles in PE cup and in PS cup ($p < 0.05$) which were manufactured by company B.

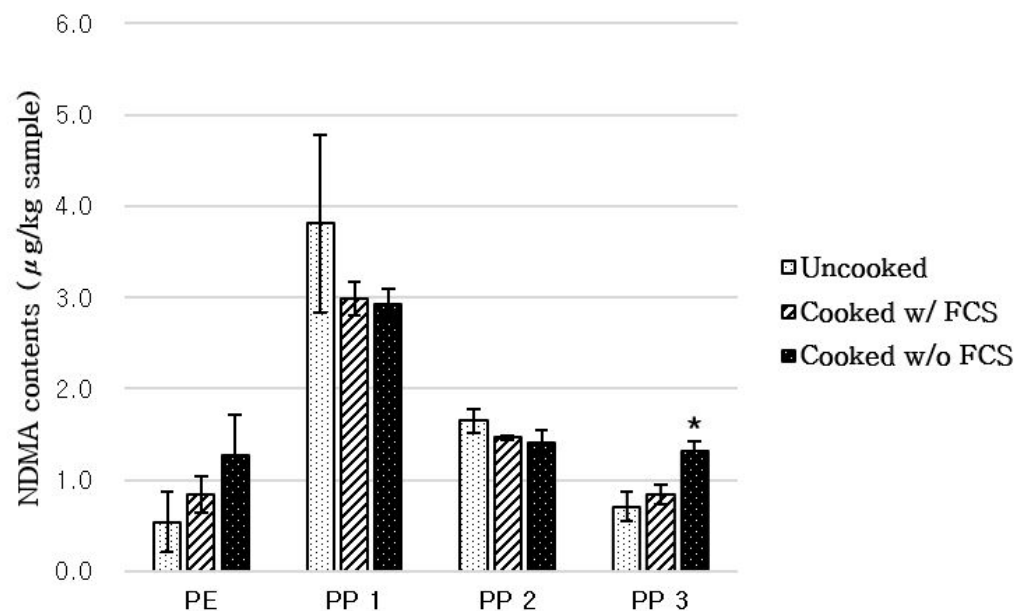


Figure 11 Comparison of NDMA contents in sauces contained in retort pouch

Except PP 3(tomato sauce), there were no significant differences between contents of NDMA in the cooked samples and that of the uncooked samples. Error bars indicate standard deviations calculated from triplicates.

* Significant difference between the uncooked sample and cooked sample without FCS(Food Contact Substances) ($p < 0.05$)

Table 13 The weight (Unit: g) and proportion(%) of each constituent of instant noodles

Company		Noodle	Seasoning	Dehydrated vegetable	Water	Total
A	PE	55	8	1	248	312
	%	17.63	2.56	0.32	79.49	100
	PS	100	14	2	397	513
	%	19.49	2.73	0.39	77.39	100
B	PE	55	6	2	248	311
	%	17.68	1.93	0.64	79.74	100
	PS	101	13	2	397	513
	%	19.69	2.53	0.39	77.39	100
C	PE	55	9	1	257	322
	%	17.08	2.80	0.31	79.81	100
D	PS	101	11	2	397	511
	%	19.77	2.15	0.39	77.69	100

4.3. 라면 시료의 구성요소 분석

라면 시료에서 조리 시 NDMA 증가의 원인을 분석하기 위해 조리된 라면을 구성하는 요소를 면, 분말스프, 건더기스프, 물로 나누고 가능한 조합들을 분석하였다.

4.3.1. 물에서의 니트로사민 분석

식수에서 NDMA가 6.4–13.9ng/L, NDEA 1.9–16.3ng/L, NDBA가 1.0–19.9ng/L로 검출된 연구가 있으며(Wang et al., 2011) 물에서의 오염가능성이 제기되었다. 물에서의 니트로사민을 분석하기 위한 전처리는 실험과정이 불필요하며 오염가능성을 방지하기 위해 저지방 시료의 전처리 방법에서 고체상지지액체추출 이후 SPE를 진행하지 않고 바로 농축하여 진행하였다. 서정은(2015)의 연구에서 물에서는 NDEA가 미량으로 검출된 것 외에 다른 니트로사민은 검출되지 않았지만 ‘물(blank)–그대로+blended’에서 NDMA, NDEA, NDBA가 검출되었고 NDMA는 $0.98 \pm 0.72 \mu\text{g/kg}$ 으로 상당히 증가하였다. 식품시료를 준비하는 과정에서 균질화과정이 필요하며 이 과정에서 열이 발생하여 니트로사민 생성에 기여할 가능성이 있기 때문에 분석을 진행하였다. 따라서 조리수로 사용한 수돗물과 HPLC용 물을 ‘조리 전’, ‘조리 전 분쇄기 처리’, ‘끓이기’, ‘끓이기 후 분쇄기 처리’로 나누어서 분석을 진행하였다. 분쇄기 처리한 샘플은 20초 동안 분쇄기를 처리한 후 10초 동안 식히는 과정을 4회 반복하여 2분 동안 진행하였다. 분석한 결과 모든 시료에서 니트로사민 3종 모두 검출되지 않았다.

4.3.2. 컵라면의 구성요소에서의 니트로사민 분석

라면의 유탕면은 원료배합 후 압연으로 모양을 만든 후 증숙으로 찐 후에 유탕처리를 하고 상온에서 냉각하는 과정으로 생산된다(농수산물유통공사, 2010). 면의 제조공정에서 수분과 접촉하는 증숙과정이나 기름에 의한 유탕과정에서의 오염, 상온 냉각 시 공기에 의한 오염이 우려된다. 따라서 면에 끓는 물을 가했을 경우를 조사하고자 하였다. 조리수는

수돗물에서 오는 요인을 배제하기 위해 HPLC용 물을 사용하였고 용기에서 오는 요인을 배제하기 위해 용기를 제거하고 조리를 진행하였다. 전처리는 저지방시료 방법을 따랐으며 그 결과 B사의 PE제품과 C사의 PE제품, D사의 PS제품에서는 NDMA가 미량으로 검출되었지만 조리된 라면에서의 함량 증가를 설명하기엔 불충분하였다.

분말 스프는 다양한 조미료가 혼합되어있는 형태이다. 조미료에서는 다른 식품보다 NDMA 함량의 최대치가 $13.48 \mu\text{g/kg}$ 으로 검출되었으며, NPYR, NPIP의 최대치는 각각 $6.48 \mu\text{g/kg}$, $6.53 \mu\text{g/kg}$ 으로 얻어졌고, NDEA, NDBA도 정량한계 이상으로 검출되었다(Park et al., 2015). 본 연구에서는 라면의 조리 전 시료에서는 니트로사민이 검출되지 않았으므로 물을 통해 열이 가해졌을 때의 변화를 확인하였다. 스프에 끓는 물을 부어서 조리한 시료는 물의 제거를 위해 저지방시료 전처리법을 따랐다. 분석 결과, 스프에 끓는 물을 첨가하여 조리한 시료 모두 니트로사민이 검출되지 않았다.

건더기 스프는 돼지고기와 파, 표고버섯, 당근, 청경채, 파프리카, 미역 등을 말린 것으로 이루어져있다. 표고버섯 말린 것과 파프리카, 푸른 잎채소(서정은, 2015), 육가공품(박종은, 2016)에서 니트로사민이 오염될 가능성이 있기 때문에 조사가 필요하였다. 하지만 건더기 스프의 양은 조리된 총 중량에서 차지하는 비율이 0.31-0.64%로 낮으며 시료에서 면과의 분리 및 균질화가 어려워 면과 건더기스프를 함께 조리한 시료를 면만 조리한 시료와 비교하고자 하였다. 하지만 이 경우에도 니트로사민이 검출되지 않았다. 또한 분말스프, 건더기스프와 물의 조합의 경우를 확인하였으나 니트로사민이 검출되지 않았다.

하지만 면과 분말스프를 끓는물로 조리하였을 때 PE 그룹에서 NDMA가 $0.42 \sim 0.46 \mu\text{g/kg}$ 으로 검출되었고 PS 그룹에서 미량으로 검출되었다. PS 그룹에서는 면, 분말스프, 건더기스프를 모두 함께 조리하였을 때보다 적게 검출되었다. 따라서 컵라면 시료는 면과 분말스프

내의 니트로사민 전구체가 NDMA 생성에 기여하는 것으로 추정되며 건더기스프도 NDMA 함량 증가에 기여하는 것으로 보였다. 컵라면을 조리할 때 식품구성요소 중 함유되어 있던 반응물이 조리 중 물에 용해되어 반응이 진행되었을 것으로 추정되며 각 구성요소 내의 전구체에 대한 검토가 필요하다.

Table 14 Contents of NDMA in various combinations of noodles, seasonings, dehydrated vegetable, water
(Unit: $\mu\text{g/kg}$ sample)

	PE A	PS A	PE B	PS B	PE C	PS D
Uncooked	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cooked without FCS	trace	0.78 ± 0.14	trace	0.93 ± 0.04	0.39 ± 0.19	0.82 ± 0.26
water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
blended water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
boiled water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
boiled and blended water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
noodle+boiled water	ND	ND	trace	ND	trace	trace
seasoning+boiled water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
noodle+dehydrated vegetable+boiled water	ND	ND	ND	ND	ND	ND
seasoning+dehydrated vegetable+boiled water	ND	ND	trace	ND	ND	ND
noodle+seasoning +boiled water	0.46 ± 0.19	trace	0.46 ± 0.14	trace	0.42 ± 0.11	trace

^a FCS: Food contact substance
^b ND: Not detected
^c trace: <MQL

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 식품을 용기·포장 채로 조리하는 경우 니트로사민의 함량이 증가하는 사례에서 용기·포장에서의 니트로사민이 용출되는지 확인하였다. 조리를 할 수 있는 용기·포장 31종에 대해 각 식품 유형별로 식품유사용매를 선택하여 단면용출시험을 진행하였다. 31종의 식품 용기·포장의 재질은 주로 폴리에틸렌(PE), 폴리스티렌(PS), 폴리프로필렌(PP), 금속제였다. 용출 시험을 진행한 결과, 용기·포장에서는 NDMA, NDEA, NDBA가 모두 정량한계 미만으로만 검출되었다. 따라서 용기·포장물질에서 식품유사용매로의 용출은 미미하였고 식품유사용매가 아닌 특정 식품에 의한 차이가 있는지 확인하고자 하였다.

식품은 각 재질별로 제조사를 편중되지 않게 대표식품을 정하였고 선행연구에서 라면의 조리 시 니트로사민이 생성되어 PE, PS 각각 3개사의 라면을 시료로 정하였다. 각 식품은 용기·포장의 유무와 조리수에 차이를 두어 조리한 시료를 제작하였다. 그 결과 토마토소스를 제외한 레토르트 시료는 조리 전과 후의 유의적인 함량 차이가 없었으며, 토마토소스는 용기·포장을 제거하고 조리한 시료만 유의적으로 함량이 높았다. 하지만 레토르트 시료 모두 NDMA의 함량이 정량한계 이상으로 검출되었으며 이는 제품 제조과정에서 들어가는 원재료와 재료들을 넣고 조리하는 과정에서 생성되었을 가능성이 크다. 라면 시료의 경우는 모든 시료에서 용기·포장의 영향 없이 조리 후 시료가 조리 전보다 유의적으로 함량이 증가하였으며, 같은 제조사의 PS그룹이 PE 그룹보다 유의적으로 NDMA가 높게 검출되었다. 하지만 이는 각 그룹에서 용기·포장 채로 조리한 것과 용기·포장을 제거하고 조리한 것의 NDMA 함량 차이가 유의적이지 않았기 때문에 재질에 의한 차이보다는 제조과정과 성분차이에 의한 것으로 추정된다.

조리 시 유의적으로 함량이 증가한 컵라면 시료의 경우 함량 증가의 원인을 파악하기 위해 구성요소인 면, 분말스프, 건더기스프, 물을 면밀히 검토하였다. 물의 경우 끓이기와 blend의 여부에 따라 4가지 조합의 NDMA 함량을 확인하였으나 검출되지 않았으며 면과 분말스프를 따로 조합한 시료에서도 검출되지 않았다. 따라서 면과 분말스프를 조리하였을 때와 면, 분말스프, 건더기스프를 함께 조리하였을 때에서만 모든 시료에서 NDMA가 검출되었다. 물이라는 매개체를 통해 면과 분말스프의 화합물이 만나 반응하여 NDMA가 생성되는 것으로 추정되며 원인이 되는 성분을 찾는 후속연구가 필요하다.

V. 참고문헌

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR), 1989, Toxicological profile for N-nitrosodimethylamine, *Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service*, 1-132.

Bai X., Byun B.Y. and Mah J.H., 2013, Formation and destruction of biogenic amines in *Chunjang* (a black soybean paste) and *Jajang* (a black soybean sauce), *Food Chemistry*, 141, 1026-1031.

Barnes J.M. and Magee P.N., 1954, Some toxic properties of dimethylnitrosamine, *British Journal of Industrial Medicine*, 11, 167-174.

Bartsch H. and Montesano R., 1984, Relevance of nitrosamines to human cancer, *Carcinogenesis*, 5, 1381-1393.

Bertram J.S. and Craig A.W., 1970, Induction of bladder tumours in mice with dibutylnitrosamine, *British Journal of Cancer*, 24, 352-359.

Bulushi I.M.A., Poole S., Deeth H.C. and Dykes G.A., 2009, Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 369-377.

Cappillas C.R. and Colmenero F.J., 2004, Biogenic amines in

meat and meat products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 489-499.

Clapp N.K. and Craig A.W., 1967, Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice, *Journal of the National Cancer Institute*, 39, 903-916.

Drabik-Markiewicz G., Dejaegher B., De Mey E., Kowalska T., Paelinck H. and Heyden Y.V., 2011, Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat, *Food Chemistry*, 126, 1539-1545.

Ender F., Harve G., Koppang N., Madsen R. and Ceh L., 1964, Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring, *Naturwissenschaften*, 51, 637-638.

Electronic Code of Federal Regulations, Food and drugs Title 21, http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=680b11217a812a276fed78ff3559ffae&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21cfrv3_02.tpl#0, accessed June 3, 2016.

European Union(EU), Release of N-nitrosamines from rubber teats, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=URISERV%3A121088>, accessed June 1, 2016.

European Union(EU), DIRECTIVE 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council,

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32009L0048>, accessed June 2, 2016.

Fan T.Y and Tannenbaum S.R., 1973a, Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morpholine and nitrite: acceleration by thiocyanate and other anions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 237–240.

Fan T.Y and Tannenbaum S.R., 1973b, Natural inhibitors of nitrosation reactions: The concept of available nitrite, *Journal of Food Science*, 38, 1067–1069.

Fine D.H., Ross R., Rounbehler D.P., Silvergleid A. and Song L., 1977, Formation in vivo of volatile N-nitrosamines in man after ingestion of cooked bacon and spinach, *Nature*, 265, 753–755.

Gangolli S.D., Brandt P.A. V. J. Feron, Janzowsky C., Koeman J.H., Speijers G.J.A., Spiegelhalter B., Walker R. and Wishnok J.S., 1994, Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds, *European Journal of Pharmacology*, 292, 1–38.

Garcia-mata M., Bosch-bosch N. and Perez-rodriguez M.L., 1995, Effect of cooking on nitrate in dehydrated soups, *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 45–48.

Gough T.A. and Goodhead K., 1975, Occurrence of volatile nitrosamines in spice premixes, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, 1473–1478.

Gough T.A., Webb K.S. and Coleman R.F., 1978, Estimate of the volatile nitrosamine content of UK food, *Nature*, 272, 161–163.

Gray J.I. and Dugan L.R., 1975, Inhibition of N–nitrosamine formation in model food systems, *Journal of Food Science*, 40, 981–984.

Hazardous Substances Data Bank(HSDB), National Library of Medicine, <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>, accessed June 1, 2016.

Herrmann S.S., Duedahl–Olesen L. and Granby K., 2015, Occurrence of volatile and non–volatile N–nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment, *Food Control*, 48, 163–169.

Herrold K.M. and Dunham L.J., 1963, Induction of tumors in the Syrian hamster with diethylnitrosamine(N–nitrosodiethylamine), *Cancer Research*, 23, 773–777.

Hotchkiss J.H. and Vecchio A.J., 1983, Analysis of direct contact paper and paperboard food packaging for N–nitrosomorpholine and morpholine, *Journal of Food Science*, 48, 240–242.

International Agency for Research on Cancer(IARC), 1978, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, 17.

International Agency for Research on Cancer(IARC), 2016, Agents classified by the IARC monographs, volume 1–115.

International Life Sciences Institute(ILSI), 2002, ILSI Europe report series: packaging materials–polystyrene for food packaging applications.

Jensen R.K. and Sleight S.D., 1987, Toxic effects of N-nitrosodiethylamine on nasal tissues of Sprague–Dawley rats and golden Syrian hamsters, *Fundamental and Applied Toxicology*, 8, 217–229.

Kim S.H., 2009, Study on establishment of specification and analytical method for nitrosamines in rubber food contact materials, *KFDA final report project* No. 09071KFDA008.

Krasner S.W., Mitch W.A., McCurry D.L., Hanigan D. and Westerhoff P., 2013, Formation, precursors, control and occurrence of nitrosamines in drinking water: a review, *Water Research*, 47, 4433–4450.

Li L, Wang P., Xu X. and Zhou G., 2012, Influence of various cooking methods on the concentrations of volatile N-nitrosamines and biogenic amines in dry-cured sausages, *Journal of Food Science*, 77, 560–565.

Lijinsky W. and Epstein S.S., 1970, Nitrosamines as environmental carcinogens, *Nature*, 225, 21–23.

Lijinsky W. and Reuber M.D., 1984, Carcinogenesis in rats by nitrosodimethylamine and other nitrosomethylalkylamines at low doses, *Cancer Letters*, 22, 83–88.

Lijinsky W., Kovatch R.M. and Riggs C.W., 1987, Carcinogenesis by nitrosodialkylamines and azoxyalkanes given by gavage to rats and hamsters, *Cancer Research*, 47, 3968–3972.

Maduagwu E.N. and Bassir O., 1980, A comparative assessment of toxic effects of dimethylnitrosamine in six different species, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 53, 211–219.

Magee P.N. and Barnes J.M., 1956, The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine, *British Journal of Cancer*, 10, 114–122.

Maki T., Tamura Y., Shimamura Y. and Naoi Y., 1980, Estimate of the volatile nitrosamine content of Japanese food, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 257–261.

Mirvish S.S., Wallcave L., Eagen M. and Shubik P., 1972, Ascorbate–nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N–nitroso compounds, *Science*, 177, 65–68.

Mirvish S.S., 1975, Formation of N–nitroso compounds: chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 31, 325–351.

Mitacek E.J., Brunnemann K.D., Suttajit M., Martin N., Limsila T., Ohshima H. and Caplan L.S., 1998, Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 297–305.

Montesano, 1981, Alkylation of DNA and tissue specificity in nitrosamine carcinogenesis, *Journal of Supramolecular Structure*, 17, 259–273.

Nawrocki J. and Andrzejewski P., 2011, Nitrosamines and water, *Journal of Hazardous Materials*, 189, 1–18.

Nerin C., Aznar M., Carrizo D., 2016, Food contamination during food process, *Trends in Food Science & Technology*, 48, 63–68.

Park J.E., Seo J.E., Lee J.Y. and Kwon H.J., 2015, Distribution of seven N-nitrosamines in food, *Toxicological Research*, 31, 279–288.

Pensabene J.W., Fiddler W. and Gates R.A., 1995, Nitrosamine formation and penetration in hams processed in elastic rubber nettings: N-nitrosodibutylamine and N-nitrosodibenzylamine, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43, 1919–1922.

Reaxys, <http://www.reaxys.com>, accessed June 1, 2016.

Rostkowska K., Zwierz K., Rozanski A., Moniuszko-Jakoniuk J. and Roszczenko A., 1998, Formation and metabolism of N-nitrosamines, *Polish Journal of Environmental Studies*, 7, 321–325.

Santos M.H.S., 1996, Biogenic amines: their importance in food, *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213–231.

Sen N.P., Kushwaha S.C., Seaman S.W. and Clarkson S.G., 1985, Nitrosamines in baby bottle nipples and pacifiers: occurrence, migration, and effect of infant formulas and fruit juices on *in vitro* formation of nitrosamines under simulated gastric conditions, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 33, 428–433.

Sen N.P., Seaman S. and Miles W.F., 1979, Volatile nitrosamines in various cured meat products: effect of cooking and recent trends, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 27, 1354–1357.

Sen N.P., Smith D.C. and Schwinghamer L., 1969, Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice, *Food and Cosmetics Toxicology*, 7, 301–307.

Seo J.E., Park J.E., Lee J.Y. and Kwon H.J., 2016, Determination of seven N-nitrosamines in agricultural food matrices using GC-PCI-MS/MS, *Food Analytical Methods*, 9, 1595–1605.

Spiegelhalder B. and Preussmann R., 1983, Occupational nitrosamine exposure. 1. rubber and tyre industry, *Carcinogenesis*, 4, 1147–1152.

Sumi Y. and Miyakawa M., 1983, Susceptibility of germ-free rats to the hepatotoxic effects of dimethylnitrosamine of dimethylamine plus sodium nitrite administered orally, *Cancer Research*, 43, 2942–2946.

Swann P.F. and Magee P.N., 1968, Nitrosamine-induced carcinogenesis, *Biochemical Journal*, 110, 39–47.

Tanaka A., Hisanaga A., Inamasu T., Hirata M. and Ishinishi N., 1988, A comparison of the carcinogenicity of N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodimethylamine after intratracheal instillation into Syrian golden hamsters, *Food Chemistry Toxicology*, 26, 847–850.

Terracini B., Palestro G., Gigliardi M.R. and Montesano R., 1966, Carcinogenicity of dimethylnitrosamine in swiss mice, *British Journal of Cancer*, 20, 871–876.

Tice P., 2002, ILSI Europe report series: packaging materials–polypropylene for food packaging applications, *International Life Sciences Institute*.

Tice P., 2003, ILSI Europe report series: packaging materials–polyethylene for food packaging applications,

International Life Sciences Institute.

Tricker A.R., 1997, N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids, *European Journal of Cancer Prevention*, 6, 226–268.

Tricker A.R. and Preussmann R., 1991, Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential, *Mutation Research*, 259, 277–289.

Tricker A.R., Siddiqi M. and Preussmann R., 1988, Occurrence of volatile N-nitrosamines in dried chillies, *Cancer Letters*, 38, 271–273.

United States Environmental Protection Agency (EPA) Integrated Risk Information System (IRIS),
https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/search/index.cfm?first_letter=N,
accessed June 1, 2016.

USDA Foreign Agricultural Service, Global agricultural information network, China's maximum levels for contaminants in foods,
<http://www.fas.usda.gov/data/china-china-s-maximum-levels-contaminants-foods>, accessed June 2, 2016.

U.S. Food and Drug Administration (FDA), CPG Sec. 500.450 Volatile N-nitrosamines in rubber baby bottle nipples,
<http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074418.htm>, accessed June 2, 2016.

U.S. Food and Drug Administration(FDA), CPG Sec. 510.600
Dimethylnitrosamine in malt beverages,
<http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074433.htm>, accessed June 2, 2016.

U.S. Food and Drug Administration(FDA), CPG Sec. 578.500
Dimethylnitrosamine (DMNA) in barley malt,
<http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074611.htm>, accessed June 2, 2016.

Wainright T., 1986, The chemistry of nitrosamine formation: Relevance to malting and brewing, *Journal of the Institute of Brewing*, 92, 49–64.

Wang W., Ren S., Zhang H., Yu J., An W., Hu J. and Yang M., 2011, Occurrence of nine nitrosamines and secondary amines in source water and drinking water: potential of secondary amines as nitrosamine precursors, *Water Research*, 45, 4930–4938.

Wolff I.A. and Wasserman A.E., 1972, Nitrates, nitrites, and nitrosamines, *Science*, 177, 15–19.

Yamamoto M., Iwata R., Ishiwata H., Yamada T. and Tanimura A., 1984, Determination of volatile nitrosamine levels in foods and estimation of their daily intake in Japan, *Food and Chemical Toxicology*, 22, 61–64.

Yamazaki H., Inui Y., Yun C.H., Guengerich F.P and Shimada T., 1992, Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major

catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes, *Carcinogenesis*, 13, 1789-1794.

Yurchenko S. and Mölder U., 2007, The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products, *Food Chemistry*, 100, 1713-1721.

김평청, 1998, 클로라민의 소독특성에 관한 연구, *건국대학교 석사 학위 논문*.

김동술 외, 2009, 기준·규격 검토를 위한 식품 중 니트로사민류 노출량 평가, 과제번호 09071식품위153.

김용석 외, 2012, 용기·포장 이행물질 안전평가를 위한 기반연구, 과제번호 12162식품안009.

농수산물유통공사, 2010, 가공식품 세분화 시장 현황조사: 라면시장 편.

박중은, 2016, 축산물 및 그 가공품에 대한 니트로사민 분석법 정립 및 적용, *서울대학교 석사 학위 논문*.

서정은, 2015, 7종 니트로사민 분석법 정립 및 농산식품에 대한 적용, *서울대학교 석사 학위 논문*.

식품의약품안전처, 2013a, 기구 및 용기포장 용출시험에 대한 식품유형별 침출용매 적용 가이드, 2013.10.01.

식품의약품안전처, 2013b, 기구 및 용기·포장 이행물질 분석법 해설서, 2013.05.

식품의약품안전처, 2014a, 식품용 기구 및 용기포장 소책자-주부용. 2014.02.

식품의약품안전처, 2014b, 기구 및 용기포장의 기준 및 규격 고시전문, 고시 제2014-27호, 2014.02.13.

식품의약품안전처, 2015, 기구 및 용기포장의 기준 및 규격 고시전문, 고시 제2015-7호, 2015.03.12.

통계청, 2016, 식품 및 식품첨가물 생산 실적 : 식품산업 생산실적.

한국농수산물유통공사, 2016, 가공식품 소비자 분석, 농림축산식품부.

Abstract

Factors Attributing to the Formation of N-Nitrosamines in Instant Foods

Bo Kyung Suh

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

N-nitrosamines are formed by reaction of amines and nitrogen oxides or can be formed during heating, processing, storage and packaging. There is only migrant specification about N-nitrosamines for baby nipples regulated by the Korea Food and Drug Administration(KFDA). There is no regulation for other food contact substances(FCS) and the studies of N-nitrosamines migration from FCS were rather limited. As demands for instant foods increase, the size of food container and packaging market enlarges. A pilot study has shown the increases of N-nitrosamines contents when cooking instant noodles. It is necessary to monitor the migration of N-nitrosamines from the food packaging materials to food simulants and examine the change of the N-nitrosamines contents when cooking instant foods.

For the migration test in the present study, 31 samples were

selected and N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA) and N-nitrosodibutylamine (NDBA) were analyzed. Water, 4% acetic acid and n-heptane were used for food simulants. A solid supported liquid-liquid extraction (SLE) using Extrelut NT was employed for water and 4% acetic acid test solutions. A solid phase extraction (SPE) using Florisil was applied for preparation of migration test solution, n-heptane. The extracts were analyzed by gas chromatography positive chemical ionization tandem mass spectrometer (GC-PCI-MS/MS) adopting ammonia gas as an ion source. In the tested food simulants, the correlation coefficient (R^2) values were above 0.99. Method detection limits (MDLs) for all of the investigated N-nitrosamines were ranged from 0.03 to 0.07 $\mu\text{g/kg}$. In all test solutions, N-nitrosamines were detected under method quantitation limits (MQLs). Food samples were also investigated to assure that there is no effect of FCS when cooking instant foods. Fatless samples with less than 10% fat content, were purified by a combination of SLE using Extrelut NT and the SPE using Florisil. Liquid extraction using acetone and acetonitrile accompanied by a fat filtration with C-18/alumina combination was applied for fatrich samples. The extracts were also analyzed by GC-PCI-MS/MS. As a result, three N-nitrosamines were not detected in instant rice and 'udon' contained in polypropylene coated paper cup. In 'udon' of aluminium container, only NDMA was detected as trace. In retort sauces such as curry, black soybean sauce and tomato sauce, NDMA concentration was ranged from 0.54 to 3.81 $\mu\text{g/kg}$. All retort samples except tomato sauce, there were no significant differences between unheated and heated samples. However, the contents of NDMA

in all of the instant noodle samples were significantly increased when cooked ($p < 0.05$). No effects from the food contact substances or cooking water was observed. To determine the cause of increasing contents of cooked instant noodles, water used for cooking was examined. NDMA was not detected in all water samples when it is boiled or blended. Only when seasoning powder and noodle were cooked together, NDMA was detected. Individual components (noodle, seasoning powder or dried vegetable) or other combination such as noodle and dried vegetable did not generate N-nitrosamines. Therefore, it is supposed that NDMA may be formed from the precursors in noodles and seasoning powders when they are solubilized in the medium of water.

.....

Key words : N-nitrosamine, Migration, Food contact substances,
Instant food, Cooking

Student Number : 2014-22890